

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2004-208583

(43)Date of publication of application : 29.07.2004

(51)Int.Cl.

C12N 15/09
A01K 67/027
C07K 14/705
C07K 16/28
C12N 1/15
C12N 1/19
C12N 1/21
C12N 5/10
C12Q 1/02
C12Q 1/68
G01N 33/15
G01N 33/50

(21)Application number : 2002-381558

(71)Applicant : MOCHIDA PHARMACEUT CO LTD
RESEARCH ASSOCIATION FOR
BIOTECHNOLOGY

(22)Date of filing : 27.12.2002

(72)Inventor : ISOGAI TAKAO
SUGIYAMA TOMOYASU
WAKAMATSU AI
IRIE RYOTARO
ISHII SHIZUKO
TAKAHASHI TOMOHIRO
SATO HIROYUKI
MANABE TADASHI

(54) NEW IMMUNOSUPPRESSIVE RECEPTOR

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a pharmaceutical and a method useful for preventing and treating immune diseases.

SOLUTION: A gene(mcd055) of a new immunosuppressive receptor involved in the regulation of immune function and a protein(MCD055) encoded by the gene are provided respectively. A method for efficiently evaluating an activity regulator for the protein is provided. A recombinant vector containing the DNA and a cell transformed by the vector are provided respectively. A method for searching the activity regulator for the protein is provided. An antibody reactive to the protein or a partial peptide thereof is also provided.

* NOTICES *

JPO and INPI are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.**** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1]

The following (a) or protein of (b);

- (a) Protein which becomes the array number 2 from an amino acid sequence of a description;
- (b) An immunosuppressive receptor which amino acid becomes from deletion and an amino acid sequence replaced or added in an amino acid sequence of the array number 2.

[Claim 2]

DNA given in either of the following (a) – (c);

- (a) DNA which becomes the array number 1 from a base sequence of a description;
- (b) DNA which hybridizes on DNA of the array number 1, and stringent conditions, and encodes an immunosuppressive receptor;
- (c) DNA which encodes protein of a description in Claim 1

[Claim 3]

A recombinant vector containing the DNA according to claim 2.

[Claim 4]

A transformed cell transformed by the recombinant vector according to claim 3.

[Claim 5]

Antisense nucleic acid which controls a manifestation of the protein according to claim 1.

[Claim 6]

The antisense nucleic acid according to claim 5 whose base sequence is all or arrangement which carries out complementary in part of nucleic acid of the DNA according to claim 2.

[Claim 7]

An antibody to protein according to claim 1 or its partial peptide.

[Claim 8]

A search method of a substance in which activity accommodation of this protein is shown contacting a transformed cell which has revealed the protein according to claim 1 or this protein, and an examined substance.

[Claim 9]

A search method of a substance in which an expression control operation of the DNA according to claim 2 is shown contacting a recombinant vector, or a transformed cell according to claim 4 according to claim 3 and an examined substance.

[Claim 10]

A mcd055 gene-recombination nonhuman animal.

[Translation done.]

* NOTICES *

JPO and INPI are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention]

DNA in which this invention encodes a new immunosuppressive receptor and its partial peptide, and this protein, and its fragment. It is related with the antibody and gene recombination nonhuman animal which have reactivity in the search method of the substance in which the activity accommodation of a transformed cell and this protein transformed by the recombinant vector containing this DNA and this recombinant vector is shown, this protein, or its partial peptide.

[0002]

[Description of the Prior Art]

By communicating with other cells, the cell is controlling the function and growth of a cell, and differentiation. The cell adhesion molecule of the immunocompetent cell which participates in all immunoreaction in the living body deeply also in a cell adhesion molecule (cellular adhesion molecule) is an important thing which adjusts the immune function itself.

[0003]

The immunoglobulin domain is found out by very much protein by the immune system and the nervous system.

It is found out also in much other protein which furthermore participates in an intercellular recognition mechanism.

These molecules are named generically and it is called an immunoglobulin super family. Although many cell adhesion molecules with immunoglobulin domain structure are known, IL-1 receptor, gp130, a PDGF receptor, etc. are mentioned, for example.

[0004]

ITIM (Immunoreceptor Tyrosine based Inhibition Motif) is a motif accepted in common with an immunosuppressive receptor, Phosphatase and SH2 domain which will be called SHP1 (SH2-containing protein tyrosine phosphatase-1) and SHP2 if the tyrosin residue contained in this motif is phosphorylated. It is known that lipid phosphatase SHIP (SH2-containing inositol polyphosphate 5-phosphatase) which it has will join together. This phosphatase carries out dephosphorization of tyrosine kinase, such as syk, or lipid like IP_4 or PIP_3 . As a result, it is thought by controlling the Ca ion outflow from Ca store, and the Ca ion inflow from the outside of a cell that a negative signal is caused.

[0005]

Although CTLA-4, FcgammaRIIB, Killer cell inhibitory receptor (KIR), CD22, etc. are known, the immunosuppressive receptor belonging to an immunoglobulin super family. For the break through of complicated immunoreaction in the living body and an inflammatory reaction, isolation identification of a new immunosuppressive receptor which participates in these is desired.

[0006]

[Problem(s) to be Solved by the Invention]

This invention provides prevention and the therapy of immunopathy with useful medicine and method by identifying a new immunosuppressive receptor and its gene.

[0007]

[Means for Solving the Problem]

This invention relates to a new immunosuppressive receptor (MCD055) by which a code is carried out to a new gene (referred to as mcd055), and the gene concerned. It is related with an antibody and a gene recombination nonhuman animal which have reactivity in a search method of activity pacemaker of a transformed cell transformed by recombinant vector containing this DNA and this recombinant vector, and this protein, this protein, or its partial peptide.

[0008]

(Nucleic acid)

This invention provides gene mcd055 which encodes MCD055 (it states in detail later). Gene mcd055 is DNA which encodes an immunosuppressive receptor which specifically consists of an amino acid sequence shown in the array number 2. Although cDNA shown in the array number 1 or the array number 3 as an example is mentioned, it is not limited to these, and genomic DNA in which this cDNA besides cDNA shown in the array number 1 or the array number 3 originates is also contained. Although isolation identification of this gene can be carried out from the Homo sapiens spleen, it may be DNA prepared by the chemosynthesis techniques using the gene engineering techniques, such as general hybridization based on arrangement indicated by this Description, such as cloning and a phospho aminodite method. Although chemosynthesis DNA besides cDNA and genomic DNA etc. is contained as the gestalt, there is no restriction in particular. Even if DNA of this invention is a single strand, it may combine with DNA and RNA which have complementary arrangement, and it may form a double chain and three heavy chains in it. The sign of the DNA concerned may be carried out by enzymes and radioactive isotopes, such as horseradish peroxidase (HRP), fluorescent substance, a chemiluminescence substance, etc.

[0009]

Since arrangement of RNA drawn from this, arrangement of complementary DNA and RNA, etc. will be uniquely determined if a base sequence of mcd055 is provided, this invention, It should be understood as DNA of RNA corresponding to DNA of this invention, or this invention, and a thing which also provides DNA and RNA which have complementary arrangement. In this Description, "DNA" is synonymous with "polynucleotide."

[0010]

DNA which becomes the array number 1 from a base sequence of a description, and DNA hybridized on stringent conditions are also included in DNA of this invention.

[0011]

If protein by which hybridizes on this and stringent conditions to DNA which becomes the array number 1 from a base sequence of a description, and a code is carried out to this DNA is an immunosuppressive receptor, a variation of a base sequence is permitted. For example, existence of two or more codons which encode the same amino acid residue what is called by codon degeneracy. By variation, deletion, connection, etc. of a DNA fragment by random variation by various artificial processings, for example, site-specific mutation introduction, and variation agent processing, and restriction enzyme cutting. If it is DNA which these DNA-delay mutation object hybridizes under DNA of a description, and stringent conditions to the array number 1, and encodes an immunosuppressive receptor even if a DNA sequence changes selectively, It is not concerned with a difference with a DNA sequence shown in the array number 1, but is a thing of this invention within the limits.

[0012]

If a grade of the above-mentioned DNA-delay mutation has not less than 98% of identity still more preferably not less than 95% preferably not less than 90% with a DNA sequence of a description in the array number 1, it will be in tolerance level. BLAST (J. Mol.Evol. and Vol.36:290-300 (1993), J.Mol.Biol., and Vol.215:403-10 (1990)) can be used for judgment of the identity of a DNA sequence. Under a condition stringent as a grade to hybridize. For example, when the label of the probe is carried out by DIG DNA Labeling kit (Roche Diagnostics Cat No.1175033). For example, 37 ** 32 ** is made to hybridize in a 42 ** DIG Easy Hyb solution (Roche Diagnostics Cat No.1603558) more preferably, For example, conditions which wash 50 **

of membranes preferably in a 65 ** 0.5xSSC solution (SDS is included 0.1% (w/v)) (1xSSC 0.15 M NaCl) What is necessary is just a grade hybridized to nucleic acid given in the array number 1 by Southern hybridization of being 0.015M sodium acid citrate.

[0013]

It is thought that DNA which becomes the array number 1 from a base sequence of a description, or its partial fragment is useful as a specific probe of a disease with which protein of this inventions, such as an autoimmune disease, immune disorder, an allergic disease, an inflammatory disease, and a tumor, involves.

[0014]

DNA of this invention can be used in order to produce MCD055 in large quantities. The sign of this DNA is carried out with an enzyme etc., and it can be used in order to inspect a manifestation situation of protein of this invention in an organization. Namely, by using this DNA as a probe and checking a mRNA expression amount for an expression amount of protein of this invention in a cell as an index, A cell suitable for manufacture of protein of this invention and its culture condition can be determined, and also it is possible to diagnose a disease to which protein of this invention relates especially an autoimmune disease, immune disorder, an allergic disease, an inflammatory disease, a tumor, etc.

[0015]

The PCR-RFLP (Restrictionfragment length polymorphism) method which uses a part of DNA of this invention as a primer, Abnormalities or a polymorphism on a nucleic acid sequence can be inspected and diagnosed by methods, such as the PCR-SSCP (Single strand conformation polymorphism) method and sequencing.

[0016]

DNA of this invention can be introduced into a cell in the living body, and it can be used also for gene therapy for preventing or treating the onset of an autoimmune disease, immune disorder, an allergic disease, an inflammatory disease, a tumor, etc.

[0017]

DNA of this invention is dramatically useful to search of a compound which controls specifically preparation of a transformed cell, a production method of recombination protein MCD055 using this transformed cell further, or a manifestation of MCD055.

[0018]

a transformed cell in this invention being prepared by person skilled in the art with the application of publicly known art, for example, being marketed — or a person skilled in the art -- general — acquisition — it is possible to incorporate DNA of this invention to a suitable host cell using easy various vectors. In that case, it is possible to control a manifestation within a host cell of gene mcd055 arbitrarily by Lycium chinense under influence of a manifestation regulatory gene represented by a promotor and enhancer in gene mcd055. In production of MCD055 using a transformed host cell, this technique is used suitably, and also it becomes possible to apply to search of a substance which can adjust research or this gene expression of a manifestation control mechanism of gene mcd055 etc.

[0019]

For example, it can search contacting arbitrary examined substances and a cell transformed by a vector containing a part or all of gene mcd055 under suitable conditions for a substance which has the operation which promotes or controls a manifestation of gene mcd055 of an examined substance, or it can estimate. DNA which includes a part of mcd055 gene-expression regulatory region, 5' untranslation region, field near the translation initiation site, or translation field as some examples of gene mcd055 is mentioned.

[0020]

A transgenic animal is producible based on a mouse or other suitable animals combining DNA which is this invention, and a publicly known method. If gene mcd055 of this invention is used, it is also possible to produce what is called a knockout animal that destroyed a gene which is equivalent to mcd055 from animals other than *Homo sapiens*. It becomes possible by pathological [physical / this model animal /, biological, and] and analyzing the genetic feature to solve a function of a gene and protein concerning this invention. It also becomes possible to produce a

model animal which has only *Homo sapiens mcd055* by introducing *Homo sapiens mcd055* of this invention into this animal that is made such and by which an internality gene was destroyed. This model animal is useful to development of drugs which targeted *Homo sapiens mcd055* this introduced, and evaluation.

[0021]

(Protein MCD055)

Protein MCD055 by which a code is carried out to MCD055 is an immunosuppressive receptor which consists of an amino acid sequence shown in the array number 2. From a structural feature looked at by especially the amino acid sequence, it is judged that it is a new immunosuppressive receptor belonging to an immunoglobulin super family.

[0022]

MCD055 is a molecule which consists of 413 amino acid, and is I-beam film penetration protein which has a transmembrane domain. From 39 residue to 92 residue of an amino acid sequence shown in the array number 2, from 132 residue to 189 residue. The motif GVYYSV which is missing from a field of 228 to 285 residue, and is conjectured to be functionally equivalent to ITIM by field of a total of three immunoglobulin domains, 2 to 24 residue, and 317 to 339 residue to a transmembrane domain and a field of 375 to 381 residue exists. Although the range of these fields may produce some difference by the method of a definition of a domain, as long as the same domain is meant intrinsically, it cannot be overemphasized that it is homonymy.

[0023]

It is judged that protein MCD055 of this invention is an immunosuppressive receptor since it is revealed in an organ which is participating in immunity, such as having an immunoglobulin domain in an extracellular domain and having ITIM in an intracellular domain and a spleen, and leucocytes, directly, and a cell. It is revealed on a cell membrane of an immunocompetent cell, and an immunosuppressive receptor said here refers to a molecule which controls activity, such as cytokine production of the immunocompetent cell, and cell growth, via phosphorylation control of intracellular activation signal protein, when ligand, an antibody, etc. combine with an extracellular domain. An antibody to an extracellular domain of protein of this invention can be produced, and a manifestation in an immunocompetent cell can be checked with flow cytometer using the antibody. By a system which establishes a T lymphocyte cell strain which made protein of this invention reveal, gives a cytokine production stimulus to the cell, and measures production cytokine. It can look for an agony stick antibody [as opposed to / to an index / this invention protein for cytokine production depressant action], or peptide.

[0024]

An IL-2 production test system using an anti-CD-3 stimulus as a cytokine production stimulus is mentioned as an example. Although intracellular activation signal protein is mentioned [for example, ERK-1 or ERK-2], if it is protein in which phosphorylation is adjusted via MCD055, it will not be limited to these. That a stimulus by ligand to protein and an agony stick antibody of this invention brings a control signal to intracellular, It can check by phosphorylation control of extracellular signal-regulated kinase-1 (ERK-1) (*The Journal of Immunology* vol.165 1352-1356 (2000), Carreno et al.).

[0025]

Thus, while MCD055 holds highly the feature observed in an immunosuppressive receptor, such as having an immunoglobulin domain and having ITIM, It has the features, like a manifestation profile peculiar to MCD055 that it is revealed to a lung, liver, the heart, activation leucocytes, leucocytes, a spleen, and a trachea as shown in drawing 1 is shown. It is presumed strongly that MCD055 has played from this a characteristic role which is not in other immunosuppressive receptors in regulation of an immune function. Therefore, it is expected that Pharmaceutical Compounds Sub-Division which made MCD055 a target can serve as medicine provided with the feature which is not in the former.

[0026]

As long as it is an immunosuppressive receptor, in an amino acid sequence of protein shown in the array number 2, polypeptide or protein in which one or more amino acid consists of substitution, deletion and/, or added amino acid sequences is also within the limits of this

invention.

[0027]

Although amino-acid-residue side chains used as a proteinic component differ in hydrophobicity, an electric charge, a size, etc., respectively, some highly preservable relations are known for a meaning of not affecting the three-dimensional structure (it is also called a spacial configuration) of the whole protein substantially. About substitution of amino acid residue, for example, a glycine (Gly) and proline (Pro), Gly, an alanine (Ala) or valine (Val), leucine (Leu) and isoleucine (Ile), Glutamic acid (Glu), glutamine (Gln) and aspartic acid (Asp), asparagine (Asn) and cystein (Cys), threonine (Thr), Thr and serine (Ser) or Ala, lysine (Lys), arginine (Arg), etc. are mentioned. It is thought that they have the mutually alike character since both Ala, Val, Leu, Ile, Pro, methionine (Met), phenylalanine (Phe), tryptophan (Trp), Gly, and Cys are classified into nonpolar amino acid. As a non-charged polar amino acid, Ser, Thr, tyrosine (Tyr), Asn, and Gln are mentioned. Asp and Glu are mentioned as acidic amino acid. Lys, Arg, and histidine (His) are mentioned as basic amino acid. Even when spoiling the preservability of an above-mentioned meaning, many variation to a person skilled in the art which, in addition, does not lose an essential function of the protein is also known. Protein of the same kind saved between different living thing kinds focuses or distributes, and, as for deletion or an example which holds a still more essential function even if inserted, many some amino acid is accepted for it.

[0028]

Therefore, if it is an immunosuppressive receptor even if it is the variation protein by substitution on an amino acid sequence shown in the array number 2, insertion, deletion, etc., these can be said to be being within the limits of this invention. It being an immunosuppressive receptor will be having a function equivalent to MCD055 protein of this invention, if it puts in another way. Having an equivalent function means holding at least one activity chosen from the phosphorylation inhibiting activities of intracellular activation signal protein, cytokine production inhibiting activities, and cytostatic activity.

[0029]

In a nature, change of such amino acid is accepted like variation produced by gene polymorphism etc., and also it can be artificially performed to a person skilled in the art using a site-specific mutation method using a mutagenesis method and the various recombination gene techniques using mutagens, such as a publicly known method, for example, NTG etc. although there is no restriction in particular as long as variation protein of a mutation site and the number of amino acid is an immunosuppressive receptor — the variation number — usually — less than tens of amino acid — desirable — less than ten amino acid — more — desirable — 1 — or it is less than partly.

[0030]

In this invention, he can understand MCD055 as the whole molecule which has all the above domain structures, and also can also understand as partial peptide holding a characteristic domain, especially a domain which bears a binding affinity with ligand. It is reported for some time that a partial fragment including a ligand binding site is separated from others and a domain, with a characteristic spacial configuration held, and may exist as partial peptide (or called solubilization and a meltable type) of isolation in some film penetration type protein. Since such partial peptide holds a binding affinity with still specific ligand, search of a compound which has a binding affinity to this protein using this of it is attained. As long as it has the ligand binding ability in this meaning, if partial peptide in MCD055 is also a substance equivalent to this invention substantially, he should understand it. Immunoreaction is adjusted by competition with MCD055 (film penetration type on a cell membrane), or meltable type MCD055 the very thing functions as ligand, meltable type MCD055 is combined with a certain receptor, and a possibility of demonstrating activity which adjusts immunoreaction is also considered. Partial peptide which has such activity is also a thing of this invention within the limits. Activity which adjusts immunoreaction of meltable type MCD055 can be detected by a mixed lymphocyte reaction shown in working example 9. Activity which adjusts immunoreaction is specifically cytokine production regulation activity and/or cell-growth regulation activity.

[0031]

As a desirable mode of partial peptide, peptide which includes either an extracellular domain (25-316a.a. of the array number 2) or an intracellular domain (340-413a.a. of the array number 2), for example is mentioned. Existence of a transmembrane domain is predicted 339th near [the 317th to] the amino acid residue of an amino acid sequence of the array number 2 (when film penetration prediction program SOSUI is used). Such a difference should be permitted although by amino acid residue to where a domain is divided may get mixed up somewhat with a prediction method of a domain to be used. It is preferred to include an immunoglobulin domain at least in a viewpoint of having the activity which adjusts ligand binding ability or immunoreaction. It is preferred that ITIM of an intracellular domain is included at least in a viewpoint of having a signaling function. As long as at least one functional domain is included, all or some of other domains may connect, and it may become other protein and a fusion protein with peptide.

[0032]

A functional domain is partial peptide holding activity or a signaling function which adjusts ligand binding ability and immunoreaction. As long as a fusion protein has at least one activity chosen from activity or a signaling function which adjusts ligand binding ability as MCD055 or melttable type MCD055, and immunoreaction, there is no restriction in particular in other polypeptides connected with MCD055 partial peptide. Although desirable examples of such a fusion protein are a fusion protein with an Fc fragment of an immunoglobulin, and a fusion protein with a histidine tag, they are not limited to these. In the case of IgG, an Fc fragment consists of a hinge region, CH2 field, and CH3 field. It is usable also in a portion (for example, each field of a hinge region, CH2 field, CH3 field, or CH4 field be independent, or arbitration should put together) of an Fc fragment. Although any may be sufficient as a kind in which an immunoglobulin in this case originates, a thing of the Homo sapiens origin is preferred. moreover — necessarily not being limited about a class and a subclass — both IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2 IgM IgE IgD, etc. — although — although it is usable, IgG is a desirable example, for example.

[0033]

In protein which has a signal sequence, that from which a signal sequence was cut may be functioning as a maturation protein. Therefore, if mature peptide in which a signal sequence was removed from protein of this invention is also a substance equivalent to this invention substantially, he should understand it. In the case of MCD055, existence of a signal sequence is predicted 24th near [the 2nd to] the amino acid residue of an amino acid sequence shown in the array number 2 (when film penetration prediction program SOSUI is used). Although the range of a transit peptide field may produce some difference by a prediction program and diversity may arise in how transit peptide is removed also in protein produced experimentally. As long as it is functionally equivalent as MCD055 protein, it should be understood that it is a substance equivalent to this invention.

[0034]

Protein of this invention or its partial peptide is applicable to search of a substance which adjusts the activity of this protein. It is expected that compounds obtained through search will serve as an effective remedy or a preventive medicine to a disease to which protein of this invention relates, for example, an autoimmune disease, immune disorder, an allergic disease, an inflammatory disease, a tumor, etc.

[0035]

(Antibody)

This invention provides an antibody further combined with MCD055. An antibody of this invention is an antibody which recognizes the MCD055 whole or its partial peptide specifically as an antigen, and a monoclonal antibody and/or a polyclonal antibody are contained. It may belong to any of five classes (IgG, IgA, IgM, IgD, IgE) classified as structure, a physicochemical quality, and an immunological property of an immunoglobulin, or a subclass by a type of an H chain. It may be fragmentation, such as Fab when $(ab)^2$ when pepsin decomposes, and papain decompose an immunoglobulin, or they may be a chimeric antibody and a homization antibody. An antibody which it not only recognizes MCD055 or its partial peptide specifically, but has the function to adjust the activity of MCD055 is also contained in this invention. With an antibody which has the

function to adjust the activity of MCD055, a neutralizing antibody which checks combination of MCD055 and ligand, for example is mentioned. These antibodies are useful to detection [be / research / or / it / clinical] of MCD055, etc.

[0036]

(Antisense nucleic acid)

This invention provides what is called antisense nucleic acid that can control MCD055 biosynthesis in a nucleic acid level in the living body. A transfer stage from a genome region required for this antisense nucleic acid to make mRNA which encodes MCD055 to pre-mRNA. By a processing stage from pre-mRNA to mature mRNA, a nuclear membrane passage stage, or a translate phase to protein. It may combine with DNA or RNA which bears gene information, what affects a normal flow of transfer of genetic information and adjusts a proteinic manifestation may be meant, and it may consist of arrangement which has complementarity into the whole nucleic acid sequence of gene mcd055, or one of portions. It is the nucleic acid (DNA and RNA are included) which comprises arrangement which is equivalent to a nucleic acid sequence given in the array number 1 or the array number 3, or has complementarity preferably. When it is a form where mRNA transferred from a genome region includes an untranslation region in intron structure or a five prime end, or a three-dash terminal, I will have the considerable or function that antisense nucleic acid which has complementarity is also equivalent to antisense nucleic acid of this invention, in arrangement of this non-translating portion.

[0037]

Antisense nucleic acid of this invention contains all the various derivatives with which DNA, its spacial configuration besides RNA, and a function are similar with DNA or RNA. For example, nucleic acid which other substances combined with a three-dash terminal or a five prime end, a base of an oligonucleotide, Nucleic acid which has a base, sugar, or phosphoric acid which does not exist, nucleic acid which has skeletons (backbone) other than a sugar-phosphoric acid skeleton, etc. are mentioned to sugar, nucleic acid which substitution and ornamentation produced in any at least one of the phosphoric acid, and nature. These nucleic acid is preferred as a derivative in which at least one of nuclease tolerance, tissue selectivity, cell permeability, and the associative strength was raised. That is, as long as it has a function which can control an activity manifestation of MCD055, there is no restriction in a gestalt of nucleic acid.

[0038]

Antisense nucleic acid which has a complementary base sequence in a base sequence which is generally hybridized in this invention to a loop part of mRNA which forms a stem loop, i.e., a base sequence of a field which forms a stem loop, is preferred. Or antisense nucleic acid which is combined with near a translation initiation codon, a ribosome binding site, a capping site, and a splice site, i.e., antisense nucleic acid which has arrangement complementary to arrangement of these parts, is preferred at a point that generally the high expression inhibition effect is predictable.

[0039]

In order to make such antisense nucleic acid incorporate into intracellular and to make it act efficiently, 30 or less base 15 or more-base of things which consist of 15 or more base a base sequence which consists of the 18 or more base number of bases of 22 or less base more preferably 25 or less base are preferably preferred for chain length of antisense nucleic acid of this invention.

[0040]

The expression inhibition effect of antisense nucleic acid of this invention, A publicly known technique, for example, gene expression regulatory region of this invention, 5' untranslation region, An expression plasmid which connected reporter genes, such as luciferase, with DNA including a part of field near the translation initiation site or translation field is produced, in vitro transcription reactions (Promega: Ribo max system etc.) and in vitro translation reactions (Promega: Rabbit Reticulocyte Lysate System etc.). It can evaluate, when a gene of this invention like a system used together adds an examined substance in a system under environment transferred or translated and measures an expression amount of this reporter gene.

[0041]

Since the antisense nucleic acid of this invention can control a manifestation of MCD055 in the living body, it is useful as prevention and a treating agent of a disease to which MCD055 relates.

[0042]

[Embodiment of the Invention]

(Nucleic acid)

As an example acquired from a DNA library, DNA of this invention, A suitable genomic DNA library and cDNA library are screened by the screening procedure by hybridization, the immuno screening procedure using an antibody, etc., the clone which has the target DNA is proliferated, and there is the method of starting using a restriction enzyme etc. from there. The screening by a hybridization method, Carry out the label of the DNA which has a base sequence of a description, or its part to the array number 1 by ^{32}P etc., consider it as a probe, and arbitrary cDNA libraries are received, It can carry out by a publicly known method (for example, Molecular Cloning, such as Maniatis T., a Laboratory Manual, ColdSpring harbor Laboratory, New York, 1982). The antibody of this invention mentioned later can be used for the antibody used by an immuno screening procedure. New DNA of this invention can be obtained also by PCR (Polymerase Chain Reaction) which uses a genomic DNA library or a cDNA library as a mold. PCR based on the base sequence of a description to the array number 1 A sense primer, Produce an antisense primer and arbitrary DNA libraries are received, A publicly known method (for example, refer for Michael A.I. etc. PCR Protocols, a Guide to Methods and Applications, Academic Press, and 1990) etc. can be performed, and DNA of this invention can also be obtained. The DNA library which has DNA of this invention is chosen and used for the DNA library used by the various above-mentioned methods. If the DNA library concerned is a library which has DNA of this invention, It is usable, and anything use a commercial DNA library, or, A cell suitable for producing a cDNA library is chosen from the cell which has DNA of this invention, In accordance with a publicly known method (J. refer to it Molecular Cloning, such as Sambrook, a Laboratory Manual 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York, and 1989), A cDNA library can be produced and used.

[0043]

It is also possible to prepare with the chemosynthesis techniques, such as a phospho aminodite method, based on the arrangement indicated by this Description.

[0044]

The recombinant vector containing DNA of this invention may be a thing of what kind of gestalten, such as annular and straight chain shape. As long as DNA of this invention is required for this recombinant vector in addition all or in part, it may have other base sequences. A part is DNA which encodes partial peptide of the protein of this invention. With other base sequences, the arrangement of an enhancer, a promoter's arrangement, a ribosome junction sequence, They are things, such as a base sequence etc. of the gene used as the base sequence used for the purpose of amplification of a copy number, the base sequence which encodes transit peptide, the base sequence which encodes other polypeptides, poly A addition arrangement, splicing arrangement, the origin of replication, and a selective marker. A desirable example of the recombinant vector of this invention is an expression vector.

[0045]

It is also possible to add a translation initiation codon and a translation termination codon to DNA of this invention using a suitable synthetic DNA adapter, or to make it newly generate or to vanish restriction enzyme cutting arrangement suitable in a base sequence when modifying a gene. These are within the limits of the work which a person skilled in the art usually does, and can be processed arbitrarily and easily based on DNA of this invention.

[0046]

The vector holding DNA of this invention should just use it for the suitable vector according to the host who uses it, choosing, it is also possible to use various viruses other than a plasmid, such as a bacteriophage, a baculovirus, a retrovirus, and a vaccinia virus, and there is no restriction in particular.

[0047]

The gene expression of this invention can be made to reveal under control of a promoter sequence peculiar to this gene. If this expression system is used, search of the substance promoted or controlled can perform transfer of the gene of this invention more advantageously. Or another, suitable manifestation promoter in the upper stream of the gene of this invention can also be used for a promoter sequence peculiar to this gene, connecting or replacing. In this case, the promoter who uses it should just choose suitably according to a host and the purpose of a manifestation, for example, when a host is Escherichia coli, T7 promotor, a lac promotor, a trp promotor, lambdaPL promotor, etc.. When a host is yeast, PHO5 promotor, a GAP promotor, An ADH promotor etc. can illustrate an SV40 origin promotor, a retroviral promotor, an elongation factor 1 alpha (Elongation Factor 1alpha) promotor, etc., when a host is an animal cell, but though natural, it is not limited to these.

[0048]

The method of introducing DNA into a vector is publicly known (J. Sambrook etc.). Molecular Cloning, a Laboratory Manual 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York (New York), 1989, reference. That is, what is necessary is just to carry out ligation of each fragment obtained by digesting DNA and a vector with a respectively suitable restriction enzyme using a DNA ligase.

[0049]

(Protein)

The protein of this invention can be prepared from the cell which has revealed this protein, or tissue, It can prepare also by the method of rearranging using the suitable host cell chosen from a prokaryote or eukaryote also by the chemosynthesis method which uses a peptide synthesis machine (for example, a peptide synthesizer 433A type, the Applied Biosystems Japan, Ltd. make). However, the production and recombinant protein by the gene engineering technique are preferred from the field of the purity.

[0050]

There is no restriction in particular in the host cell made to transform using the recombinant vector of the preceding clause, E. Many cells, such as an animal cell represented by an available lower cell, an insect cell, COS7 cell, a CHO cell, and the HeLa cell in the genetic engineering technique represented by coli, B.subtilis, or S.cerevisiae, are available also to this invention.

[0051]

The transformed cell of this invention can be obtained by making a suitable host cell transform by the recombinant vector of this invention. As a method of introducing the recombinant vector of the preceding clause into a host cell, The electroporation method, the protoplast method, an alkaline metal method, a calcium phosphate precipitation method, Which method may be used although there are the publicly known methods (an experimental-medicine special issue, gene engineering handbook March 20, 1991 issue, Yodoshia, reference), such as the DEAE dextran process, a microinjection method, and a method of using virion.

[0052]

In order to produce the protein concerned in gene engineering, an above-mentioned transformed cell is cultured, culture mixtures are collected, and the protein concerned is refined. Culture of a transformed cell can be performed by a general method. Since there are various kinds of compendiums (the volume examples and for "microorganism laboratory procedure" Japanese Biochemical Society, Tokyo Kagaku Dojin Co., Ltd., 1992) about culture of a transformed cell, they can be referred to and can be performed.

[0053]

As a method of refining the protein of this invention, out of the method by which normal use is carried out to refining of protein, a suitable method can be chosen suitably and can be performed from a culture mixture. Namely, a curing salting method, an ultrafiltration method, an isoelectric point precipitation method, gel filtration technique, an electrophoresis method, Various affinity chromatography, such as ion exchange chromatography, hydrophobic chromatography, and antibody chromatography. What is necessary is to choose a suitable method suitably out of methods by which normal use may be carried out, such as the chromatofocusing method,

adsorption chromatography, and reversed phase chromatography, and just to refine in a suitable order as occasion demands using an HPLC system etc.

[0054]

It is possible to also make the protein of this invention reveal as other protein or a fusion protein with a tag (an example, a glutathione S transferase, protein A, a hexahistidine tag, a FLAG tag, others). The united type made to reveal becomes it is possible to start using suitable protease (an example, thrombin, eae TEROKAINESU, others), and possible [sometimes preparing protein more advantageously]. When what is necessary is just to have performed refining of the protein of this invention, combining suitably a technique general to a person skilled in the art and it is made revealed with especially the gestalt of a fusion protein, it is preferred to adopt a purification method characteristic of the gestalt.

[0055]

It is one of the methods which also produces the method of obtaining using a recombinant DNA molecule with the synthesizing method (J. Sambrook, et al.:Molecular Cloning 2nd ed. (1989)) of a cell free system in gene engineering.

[0056]

Thus, the protein of this invention can be prepared with its independent gestalt or the gestalt of a fusion protein with the protein of another kind, and these things [it not being restricted to seeing and transforming the protein of the invention in this application to further various gestalten] are also possible. For example, processings by the technique of the variety known by the person skilled in the art, such as combination with Polymer Division, such as various chemical modification to protein and a polyethylene glycol, and combination to an insoluble carrier, can be considered. the existence of addition of a sugar chain by the host who uses — or — to that extent — being also alike — a difference is accepted. Even if it is in this case, as long as it functions as an immunosuppressive receptor, in addition, it should be said that it is under the thought of this invention.

[0057]

The protein of this invention is applicable to screening of the substance which is used as an antigen for producing an antibody, or is combined with this protein, or the substance which adjusts the activity of this protein, and useful.

[0058]

As for MCD055 of this invention, it is possible by culturing the above transformed cells, especially an animal cell to make the cell surface high-reveal the purpose molecule. On the other hand, in manufacturing suitable fragments, such as extracellular region protein fragmentation of MCD055, as soluble protein, It can manufacture by preparing a transformed cell as mentioned above using DNA which encodes the extracellular region concerned or each domain, and making it secrete in a culture supernatant by culturing an ectoplasm conversion cell.

[0059]

On the other hand, when MCD055 exists in the peri plasm of a transformed cell, or cytoplasm, To the cell suspended to suitable buffer solution, for example, ultrasonication, freeze-thawing processing. Or after performing lysozyme treatment etc. and destroying a cell wall and/or a cell membrane, the membrane fraction which contains the protein of this invention by methods, such as centrifugal separation and filtration, is obtained, this membrane fraction is further solubilized using a suitable surface-active agent, and a rough solution is prepared. and the law from the rough solution concerned — by a method, it can isolate and objective protein can be refined.

[0060]

(mcd055 gene=recombination nonhuman animal)

This invention provides a mcd055 gene=recombination nonhuman animal. A transgenic nonhuman animal and a KO nonhuman animal are contained in a mcd055 gene=recombination nonhuman animal. When a mcd055 gene=recombination nonhuman animal incorporates artificially the gene which encodes the protein of this invention on the chromosome of this animal, the grade of a manifestation of the protein of this invention, a manifestation stage, a manifestation part, etc. are controlled. As a nonhuman animal, although a cow, a sheep, a goat, a swine, a mouse, a horse, a fowl, etc. are mentioned, for example, it is not limited to these. A nonhuman mammal is preferred

also in a nonhuman animal.

[0061]

If gene mcd055 of this invention is used, a transgenic nonhuman animal is producible. a law to which normal use of this transgenic nonhuman animal is carried out in manufacture of a transgenic animal — in accordance with a method (the volume an example, a developmental engineering experiment manual, Kodansha SAIENTIFIKU issue, and for Motonari Katsuki, Tatsuji Nomura editorial supervision, 1987), it is producible. That is, the gene or recombinant vector of this invention is introduced into the fertilized egg of a nonhuman animal, this fertilized egg is generated to an individual, and the individual by which the transgene was incorporated into the genome of a somatic cell is sorted out.

[0062]

Specifically, in the case of a transgenic mouse, DNA built so that mcd055 gene could be revealed to the pronucleus term fertilized egg acquired from normal C57Black/6 mouse is poured in directly, for example. The construct which connected and introduced mcd055 gene downstream from the suitable promotor is more specifically produced, straight-chain-shape DNA which removed the arrangement of procarcyote origin as much as possible when it was necessity after that is obtained, and this is directly poured into a pronucleus term fertilized egg pronucleus using a detailed glass needle.

[0063]

This fertilized egg is transplanted to the uterus of another false pregnancy mouse used as assumed parents. An ICR female mouse is crossed with the male mouse which cut or ligated the spermatic duct, and a false pregnancy mouse generally produces it. From the organization of ** of transplantation *****, genomic DNA is extracted, the existence of introduction of MCD055 gene is checked by the PCR method or the Southern-blotting method, and a transgenic mouse is obtained.

[0064]

Based on the base sequence of mcd055 (or mouse homologous gene of mcd055), what is called a "knockout mouse" is producible. With the "knockout mouse" in this invention. It is the mouse in which the internality gene which encodes the protein of the mouse derived of this invention was knocked out (inactivation), for example, the positive negative selection method (the US,5,464,764,B gazette.) adapting homologous recombination Are producible using the No. 5,487,992 gazette, the No. 5,627,059 gazette, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, Vol.86-8932-8935-1989, Nature, Vol.342,435-438-1989, etc.. Such a knockout mouse is also one mode of this invention. The destructive animal of this gene may be obtained as a result also by the gene disruption method of the random animal individual performed briskly in recent years. The animal it became clear destroying of this gene is one mode of this invention, when it is not concerned with whether for the destruction to have had the purpose with this clear gene, and to have been performed but destruction of the gene becomes clear.

[0065]

Or also in inside and a large animal, creation of the cloned animal by a nuclear transplantation was attained recently. In connection with this, creation of TRANS GENIC using this art and a knockout animal also actually came to be performed. That is, a core can be obtained from the cell obtained by performing homologous recombination the same with carrying out to an embryonic stem cell based on the base sequence of mcd055 (or homologous gene of mcd055 in each animal) to a somatic cell or the cell of a germ cell line, and a cloned animal can be obtained using the core. This animal is a knockout animal in which mcd055 (or homologous gene of mcd055 in each animal) was lost. Or it is also possible by introducing mcd055 (or homologous gene of mcd055 in each animal) gene into the arbitrary cells of arbitrary animals, and obtaining a cloned animal like an above-mentioned method, using the core to produce a transgenic animal. Such a KO nonhuman animal and a transgenic nonhuman animal are not concerned with the kind, but are one mode of this invention.

[0066]

(Antibody)

Both a polyclonal antibody and a monoclonal antibody can obtain the antibody of this invention

by the ability to refer to the publicly known method (for example, immunity experiment operation information, the edited by Japanese Society for Immunology, Japanese Society for Immunology issue, reference). It explains briefly [below].

[0067]

In order to obtain the new antibody concerned, if the protein of this invention is inoculated into an animal if needed with suitable adjuvants, such as Freund's complete adjuvant (FCA) and Freund's incomplete adjuvant (FIA), as immunogen and it has necessity first, a booster will be carried out at intervals of two to four weeks. Blood collecting is performed after booster and antiserum is obtained. The protein of this invention used as an antigen may be obtained by what kind of method, as long as it is a thing of the degree of refining which can be used for production of an antibody. The partial polypeptide of the protein of this invention can also be conveniently used as immunogen. What is necessary is to combine it with carriers, such as keyhole limpet hemocyanin (KLH), and just to use it as an antigen, when the polypeptide used as immunogen is low-molecular polypeptide, i.e., the polypeptide which consists of about ten to 20 amino acid. Although what kind of thing the animal which carries out immunity may be, it is preferred to desirable usually use it by a person skilled in the art from the rat used for an immunological experiment, a mouse, a rabbit, a sheep, a horse, a fowl, a goat, a swine, a cow, etc., choosing the animal species which can produce the target antibody.

[0068]

A polyclonal antibody can be obtained by refining the obtained antiserum. What is necessary is just to perform refining, combining suitably the publicly known methods, such as curing salting, ion exchange chromatography, and affinity chromatography.

[0069]

For obtaining a monoclonal antibody, it carries out as follows. That is, antibody forming cells, such as splenic cells or a lymphocyte, are extracted from the animal which carried out immunity, by the publicly known method of using a polyethylene glycol, Sendai Virus, an electric pulse, etc., it unites with a myeloma cell stock etc., and a hybridoma is produced. Then, what is necessary is to choose and cultivate the clone which is producing the antibody combined with the protein of this invention, and just to obtain by refining the culture supernatant of the selected clone. What is necessary is just to use refining, combining suitably the publicly known methods, such as curing salting, ion exchange chromatography, and affinity chromatography.

[0070]

Even if it uses the gene engineering method, the new antibody concerned is obtained. For example, mRNA is extracted from the hybridoma which produces the monoclonal antibody to the splenic cells, the lymphocyte, this invention protein, or its partial polypeptide of the animal which carried out immunity by this invention protein or its partial polypeptide, and a cDNA library is produced based on this. The clone obtained by screening the clone which is producing the antibody reacted to an antigen can be cultivated, and the target antibody can be refined combining the publicly known method from a culture mixture. When using an antibody for a therapy, the point of immunogenicity to a hominization antibody is preferred. A hominization antibody can be prepared by carrying out immunity of the mouse (example Nat. Genet. 15;146-156 (1997)) which replaced the immune system with the human thing. It can also prepare in gene engineering using the hypervariable region of a monoclonal antibody (Method in Enzymology 203; 99-121 (1991)).

[0071]

(Antisense nucleic acid)

Antisense nucleic acid can be manufactured by the publicly known method (for example, the volume Stanley T.Crooke and on Bernald Lebleu, in Antisense Research and Applications, CRC publication, Florida, 1993). If it is natural DNA and RNA, it can compound using a chemosynthesis machine or the antisense nucleic acid of this invention can be obtained by the PCR method by using MCD055 as a mold. In a derivative, a thing compoundable using a chemosynthesis machine (for example, made in applied bio-systems Japan, Inc., Expedite Model 8909) also has a methyl phosphonate type, a phosphorothioate type, etc. In this case, antisense nucleic acid can be obtained also by refining the synthetic product acquired by operating it according to the manual

attached to the chemosynthesis machine by the HPLC method using reversed phase chromatography etc.

[0072]

In using DNA and antisense nucleic acid of this invention as a probe for diagnosis, in accordance with a publicly known method, it carries out the sign of them with radioisotope, an enzyme, a fluorescent substance, or photogene. Next, DNA or mRNA is prepared by the publicly known method from a sample, by making this into an examined substance, after adding said sign probe and making it react, it washes and said unreacted sign probe is removed. If gene mcd055 or RNA is contained in the examined substance, the antisense nucleic acid concerned will be combined with them. The existence of bonding can know as an index luminescence by an enzyme, a fluorescent substance, photogene, or radioisotope etc. which carried out the sign, fluorescence, radioactivity, etc.

[0073]

When using DNA, the antisense nucleic acid, or the recombinant vector of this invention for a medicine use, it is preferred to use it with the directions for use which are permitted pharmacologically and deal in the thing of purity suitable for using it as drugs.

[0074]

DNA, the antisense nucleic acid, or the recombinant vector of this invention may use them for a directly suitable solvent, being dissolved or suspended, and it may be used, making it into the form which was enclosed in liposome or was included in the suitable vector. It may be used for suitable pharmaceutical forms, such as injections, a tablet, a capsule, ophthalmic solutions, cream pharmaceuticals, a suppository, a spray, and cataplasms, adding the auxiliary ingredients which may be permitted pharmacologically if needed, and carrying out. The auxiliary ingredients which may be permitted pharmacologically are things, such as a solvent, a base, a stabilizing agent, an antiseptic, a resolvent, an excipient, and a buffer.

[0075]

DNA, the antisense nucleic acid, or the recombinant vector of this invention can set up and use the medication method and its dose according to a patient's age, sex and the kind of disease, and a grade, when it is considered as the above pharmaceutical forms. Namely, what is necessary is to choose a suitable method from internal use or inhalation, dermal administration, instillation, the administration in a vagina, the administration in a joint, rectum administration, intravenous administration, local administration, intramuscular administration, hypodermic administration, intraperitoneal injection, etc., and just to prescribe a quantity suitable for improving symptoms for the patient.

[0076]

(Screening method)

The transformed cell in which this invention has revealed the protein of this invention, and this protein. It is characterized by using the transformed cell or mcd055 gene=recombination nonhuman animal transformed by the recombinant vector containing DNA of this invention, and this DNA, and this recombinant vector, and is related with the method of screening the substance which adjusts the function or manifestation of the protein of this invention. Prepare (1) examined substance and this examined substance is more specifically contacted to the transformed cell which has revealed the protein or this protein of this invention, The method (2) examined substance in which this examined substance consists of evaluating whether it has the operation which adjusts the activity of the protein of this invention is prepared. This examined substance is contacted to the transformed cell transformed by the recombinant vector containing DNA of this invention, or this recombinant vector, and the way this examined substance consists of evaluating whether it has the operation which adjusts mcd055 gene expression etc. are mentioned. As an example of (1), in the system shown in working example 7, 8, or 9, the activity of the protein of this invention under the bottom of examined substance existence / nonexistence is measured, and the method of choosing the examined substance which increases or decreases the activity of the protein of this invention in the bottom of existence compared with the bottom of nonexistence is mentioned. As an example of (2), mcd055 gene=expression regulatory region, 5' untranslation region, The recombinant vector

which connected reporter genes, such as luciferase, with DNA including a part of field near the translation initiation site or translation field is produced. The expression amount of this reporter gene is measured under the bottom of existence of an examined substance / nonexistence under the environment where the gene of this invention is transferred or translated, and the method of checking the transfer promotion activity or transfer inhibiting activities of an examined substance is mentioned. The transformed cell in which the screening method of this invention has revealed the protein of this invention, and this protein, The recombinant vector containing DNA of this invention, and this DNA, The process at which an examined substance is contacted with the transformed cell or mcd055 gene-recombination nonhuman animal transformed by this recombinant vector, whether the expression level of the activity of the protein of this invention in an examined substance addition group and an examined substance additive-free group or DNA of this invention has a difference. The process to detect, the process of choosing the examined substance in which the difference was accepted as the activity pacemaker of the protein of this invention or an expression control substance of DNA of this invention may be included. Any of a substance which have the operation (antagonist) which copies thru/or (mimic) enhances the activity of MCD055 protein (agonist), or checks it may be sufficient as the substance in which the operation which adjusts the activity of the protein of this invention is shown. Any of a substance which have the operation which promotes or controls the manifestation of gene mcd055 may be sufficient as the substance in which an expression control operation of DNA of this invention is shown. Whether an examined substance shows the activity accommodation of the protein of this invention, or an expression control operation of DNA of this invention. What is necessary is just to investigate whether the activity of the protein the case where an examined substance is added in the system which can check the manifestation of a system or DNA which can check proteinic activity, and in additive-free, or the expression level of DNA has a difference. With the expression level of DNA, any of the expression intensity of mRNA of mcd055 gene and proteinic expression intensity may detect. The expression level of a reporter gene may be detected not as the expression level of mcd055 gene or the MCD055 protein itself but as substitution. A reporter assay system says the assay system which screens the substance which acts on this manifestation regulatory region by making into an index the expression amount of the reporter gene arranged downstream from gene expression regulatory region to examine. As manifestation regulatory region, a promoter, an enhancer, the CAAT box usually seen in promoterregion, a TATA box, etc. can be illustrated. As a reporter gene, a CAT (chloramphenicol acetyltransferase) gene, a luciferase (luciferase) gene, a β -galactosidase (β -galactosidase) gene, etc. can be used. The gene expression regulatory region and 5' untranslation region of this invention can be acquired by a publicly known method (a new cell technology experiment protocol (Shujunsha), 1993). Having the operation which has or enhances the operation to check (or control) (or promotion) means that a difference has the measured value of proteinic activity or the expression level of DNA between an examined substance addition group and an examined substance additive-free group. For example, the inhibition (or control) rate or enhancement (or promotion) rate calculated by the following formula says more preferably that it is not less than 90% preferably especially not less than 70% still more preferably not less than 50% not less than 30% not less than 10%.

[0077]

Measured value $\times 100$ of the absolute value / additive-free group of inhibition (or control) rate or enhancement (or promotion) rate = (measured value of the measured value-examined substance addition group of an examined substance additive-free group)

[0078]

Here, about which activity of inhibition or enhancement it is, and measured value, it is suitably set by the kind of system which can check the manifestation of a system or DNA which can check proteinic activity. For example, when the system which can check proteinic activity is a system of measurement of cytokine production inhibiting activities. When the amount of cytokine production can be used as measured value and it becomes the amount of cytokine production of the amount of cytokine production > examined substance additive-free group of an examined substance addition group, it can be said that an examined substance has an MCD055 protein

activity inhibition operation. When the value of a background or a noise is contained in a system of measurement, it cannot be overemphasized that the value which deducted such a thing is made into measured value.

[0079]

Compounds obtained from the protein which is this invention being an immunosuppressive receptor through the search using an above-mentioned screening method or transgenic animal, Becoming the effective remedy or preventive medicine to an autoimmune disease, immune disorder, an allergic disease, an inflammatory disease, etc. is expected. Although protein, peptide, an oligonucleotide, a synthetic compound, a natural origin compound, a fermentation product, a cell extract, a vegetable extract, an animal tissue extract, etc. are mentioned as an examined substance, it may not be limited to this, but a new substance or a publicly known substance may be sufficient.

[0080]

[Example]

Although this invention is further explained in full detail according to the following working example, he limits this invention to these working example, and it should not be understood.

[0081]

Working example 1 Cloning of gene mcd055

(1) Acquisition of clone C-SPLEN2010588

(1-1) Production of a cDNA library, and evaluation of overall-length nature

mRNA extracted as all the RNA from the spleen (Spleen) of human tissue was purchased in the state of all the RNA (CLONTECH #64034-1). It is oligo KYAPU method [M. Maruyama and S. Sugano, Gene, and 138 from purchased RNA : The cDNA library was produced by the method (WO 01/04286) which improved 171-174] (1994). Oligo-cap linker and Oligo dT primer are used. As indicated to WO 01/04286, BAP (Bacterial Alkaline Phosphatase) processing, Composition of TAP (Tobacco Acid Pyrophosphatase) processing, RNA ligation, and the first chain cDNA and removal of RNA were performed. Subsequently, it changed into the 2 chain cDNA by PCR (polymerase chain reaction) using the PCR primer by the side of 5' a side and 3', and cut by SfiI. Subsequently, cloning of the directivity of cDNA was decided and carried out to vector pME18SFL3 (GenBank AB009864, Expression vector) which cut the cDNA fragment which carried out fractionation to 2 or more kbs by DraIII, and the cDNA library was produced. The arrangement of the PCR primer by the side of Oligo-cap linker, Oligo dT primer, and 5' a side and 3' used what was indicated to WO 01/04286.

[0082]

About the plasmid DNA of the clone obtained from these. A DNA sequencing reagent (BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit, product made by PE Biosystems) is used for the base sequence of 5' end of cDNA. According to the manual, the DNA sequence was analyzed after the sequencing reaction by the DNA sequencer (ABI PRISM 3700, product made by PE Biosystems). The obtained data was put in a database.

[0083]

It asked for the rate of an overall length of the 5'-end of about 30,000 clones of the cDNA library of the Homo sapiens spleen (Spleen) produced by the method which improved Oligo-capping method by the following method. About all the clones whose Homo sapiens known mRNA in a public database and 5'-terminal sequences correspond. Although the 5'when - end is extended - end was short for a long time than the known mRNA arrangement in a public database, the translation initiation codon judged the case where it had to be a "overall length", and judged the case where the translation initiation codon was not included to be "a non-overall length." Rate [of a 5'-end] of overall length [number of overall-length clones/(number of number of overall-length clones + non-overall-length clones)] was calculated based on this. As a result, the rate of an overall length of the 5'-end was about 90%. It turned out that the rate of an overall length of the 5'-end arrangement of the clones from the acquired cDNA library is dramatically higher than this result.

[0084]

(1-2) Selection and overall-length sequence analysis of an overall-length base sequence analysis

clone

About the five prime end arrangement of the cDNA clone produced by performing it above, homology search by GenBank and BLAST for data with the notation of complete cds of UniGene was performed, and the same thing removed in human mRNA arrangement. Next, it clusters, and when not less than 90% of homology and a consensus sequence were 50 or more base pairs, it was regarded as the same group and the group was made to form. The longer clone to a 5' side in a group was chosen, and the clone which conducts overall-length base sequence analysis was obtained.

[0085]

The base sequence of the overall length cDNA was determined by the usual method about the clone selected by overall-length base sequence analysis. The overall-length base sequence was become final and conclusive so that a partial base sequence might overlap both chains thoroughly. C-SPLEN2010588 was acquired from the inside of it.

[0086]

In clone C-SPLEN2010588. . Encode new protein MCD055 which consists of 413 amino acid expressed with the array number 2. cDNA which consists of a base sequence (array number 3) of overall-length 1997 base pair containing the open reading frame (ORF) which consists of a base sequence of 1239 bases expressed with the array number 1 was contained. This plasmid C-SPLEN2010588 is deposited with International Organism Depository, independent administrative institution National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, which is an international microorganism depository institution as accession number FERM P-19165.

[0087]

(2) Analysis of a cDNA clone base sequence and an amino acid sequence

(2-1) MCD055 amino acid sequence. a HMMER program (R. —) [Durbin and] S. By Eddy, A. Krogh, G. Mitchison. Cambridge University Press, and . (1998) a Pfam database (<http://www.sanger.ac.uk/Pfam/>). When searched, it applied to 285 residue from 92 residue, 189 residue from 132 residue, and 228 residue from 39 residue, and a total of three immunoglobulin domains were seen.

[0088]

(2-2) Film penetration prediction program (Takatsugu.) Hirokawa and Seah Boon-Chien, and Shigeki Mitaku, SOSU: Classification. and Secondary Structure. By Prediction System for Membrane Proteins and Bioinformatics (formerly CABIOS) 1998 May;14(4):378-379, film penetration part prediction. The transmembrane domain was predicted by 2 to 24 residue, and 317 to 339 residue in the amino acid sequence shown with the array number 2 as a result of carrying out. In the amino acid sequence shown with the array number 2 from this, from the 2nd Leu to the 24th Thr was predicted to be transit peptide arrangement. Since other transmembrane domains were one by the side of a C terminal, as for this protein, existing the amino terminal side in the cell membrane surface in the form towards intracellular in the C terminal side out of a cell was predicted.

[0089]

(2-3) Although [IV]Yxx[LV] is generally known as an ITIM motif (J Immunol. Vol.159(5):2075-7 (1997)), It accepted [which is conjectured to be functionally equivalent to this motif] to 375 to 381 residue of the amino acid sequence shown with the array number 2, having covered it GVVYYSVV.

[0090]

A check of the manifestation profile by working example 2 PCR

Organization manifestation profile analysis of mcd055 by RT-PCR was conducted. The Homo sapiens RNA used for analysis is as follows. the law from the Homo sapiens coronary-arteries vascular endothelial cell (HCAEC) and the Homo sapiens coronary-arteries vascular smooth muscle cell (CASM) — mRNA was prepared by the method. after cultivating Homo sapiens peripheral blood origin leucocytes under existence of 50 microg/ml PHA or nonexistence for 24 hours — mRNA — a law — it prepared by the method. Furthermore, mRNA of a human lung, the kidney, the pancreas, a spleen, the heart, a suprarenal gland, a testis, the trachea, the embryo kidney, and the brain was purchased from Clonetec, and mRNA of the large intestine was

purchased from STRATAGENE, purchasing total RNA of liver and small intestine ** from Clontech — a law — mRNA was prepared by the method. next, these every — using an oligo dT primer from mRNA 0.12microg — composition of single-strand cDNA — a law — it carried out in accordance with the method. SuperScriptIIIRNase H⁻Reverse Transcriptase (Invitrogen) was used as reverse transcriptase. mcd055 used for PCR — the arrangement of a specific primer — sense primer mcd055-F1 (5'-GTG TTG TCT ACT CTG TGG TGC- 3'). It is antisense primer mcd055-R1 (5'- AGC ATC TCC CTT CCC ATT CC- 3'). As a result of analyzing, mcd055 was revealed by a lung, liver, the heart, activation leucocytes, leucocytes, the spleen, and the trachea (drawing 1).

[0091]

Working example 3 Manifestation of meltable type MCD055 protein (MCD055 extracellular domain)

mcd055 gene was included in various expression vectors after amplification by PCR. In order to connect a histidine tag to the C terminal side using expression vector pIVEX2.4bNde (Roche Diagnostics, Inc.) in order to connect a histidine tag to the proteinic amino terminal side and to make it revealed, and to make it revealed. ***** pIVEX2.3 d (Roche Diagnostics, Inc.) was used. MCD055 protein uses and refines a nickel column, after making it revealed [according to a cell free system (Rapid Translation System:RTS) (Roche Diagnostics, Inc.)] in the form where the histidine tag was connected. Even the 339th Ser is revealed from the 317th Pro, and from the 1st Met to the 316th Val is made for an amino terminal side to reveal from it as meltable type MCD055 protein in the film penetration part search by SOSUI for a film penetration part.

[0092]

Working example 4 Production of anti-MCD055 antibody

(1) In order to produce the antibody to preparation MCD055 partial peptide of partial peptide (peptide antigen) of MCD055, Partial peptide of MCD055 is dissolved [ml] in 10mg /with distilled water, and it mixes with 10mg/ml of maleimide-ized keyhole limpet hemocyanin (PIERCE) in equivalent amount. It desalts in NAP-10 column (Amersham Pharmacia Biotech) after a 2-hour reaction with a room temperature. Protein concentration computes the used amount of KLH(s) using what was broken by volume.

[0093]

(2) Production of MCD055 antibody

(2-1) Production of a polyclonal antibody

In order to produce the rabbit polyclonal antibody to MCD055, it mixes the prepared peptide antigen each every [40micro / g], respectively, and may be 0.5 ml. Then, it mixes with equivalent weight of Freund's complete adjuvant (DIFCO), and the regions-of-back hypodermic of a rabbit is medicated. What mixed tales doses with Freund's incomplete adjuvant (DIFCO) is prescribed for the patient in two weeks, it collects blood from the ear vein after two weeks, and antiserum is prepared. Meltable type MCD055 similarly produced and refined in working example 3 is prescribed for the patient by 30microg/body, and antiserum is produced.

[0094]

(2-2) Production of a peptide antibody

Each peptide antigen 20mug which was chosen more nearly arbitrarily than the amino acid sequence of MCD055, and was prepared is dissolved in the physiological saline of 100microl, and the line of an equivalent amount of mixing is carried out to Freund's complete adjuvant. The abdominal cavity of a BALB/c mouse 5-week old scalpel is medicated, after [two weeks] peptide antigen 20mug is dissolved in the physiological saline of 100microl, it mixes with Freund's incomplete adjuvant in equivalent amount, and the abdominal cavity is medicated similarly. It collects blood from the eyegrounds after one week, and the rise of antibody titer is checked by Western blotting. That is, electrophoresis of the recombination MCD055 protein is carried out in 4-20%SDS-polyacrylamide gel (TEFCO), and it transfers on a PVDF film in accordance with the method of Millipore Corp. It blocks with after-transfer 5% skim milk and the 0.076M phosphate buffer solution (pH 6.4) (following T-PBS and description) which contains Tween20 0.05%. The

antiserum which collected blood is diluted with T-PBS which contains BSA 0.5% 500 times, and is made to react to the transferred PVDF film at 4 ** overnight. A membrane is washed 3 times by T-PBS, a peroxidase-labeling anti-mouse immunoglobulin antibody (DAKO) is diluted with T-PBS which contains BSA 0.5% 500 times, and it is made to react to a membrane at a room temperature for 1 hour. Then, ECL (Amersham Pharmacia Biotech) detects a membrane after 3 times washing by T-PBS. Check the rise of antibody titer by the above operation, and a lymphocyte is separated from splenic cells three days after the last administration of an antigen. According to the Ando **** and the Chiba length / work "a guide to monoclonal antibody experiment operation" (Kodansha), cell fusion is performed after mixing with Sp2/O-Ag14 (ATCC No.CRL1581) using a polyethylene glycol. A hybridoma is chosen by a HAT medium and the hybridoma which is producing the target antibody in one week is screened.

[0095]

using 0.01M carbonic acid buffer solution (pH 9.5), and diluting [ml] the MCD055 extracellular domain which produced and refined in working example 3 in 1 microg /— an immune plate (Maxisorb, NUNC) — 50microl / well — it adds. the 0.076M phosphate buffer solution (pH 6.4) (following PBS and description) which washes 5 times with ion exchange water after a 1-hour reaction at 37 **, and contains BSA 0.5% — each — it blocks by doing 100microl addition of at a well. next, a culture supernatant — each — after adding to a well and making it react at 37 ** for 1 hour, the physiological saline which contains Tween20 0.05% washes 3 times, diluting a peroxidase-labeling anti-mouse immunoglobulin antibody with PBS which contains a rabbit blood serum 10% 1000 times — each — 50microl addition of is done at a well. the tetramethyl benzidine solution which washes 5 times with the physiological saline which contains Tween20 0.05% after a 1-hour reaction at 37 **, and contains hydrogen peroxide 0.01% — each — it adds to a well. A reaction is suspended with 0.5M sulfuric acid solution after a reaction for 10 minutes at a room temperature. The absorbance of 450 nm is measured with a plate spectrophotometer (NJ-2100, Nihon Inter Electronics MEDDO). Based on this result, the cell reacted to MCD055 extracellular domain is chosen, and cloning is performed by limiting dilution. In ten days, it can screen similarly and the clone which produces the antibody reacted to MCD055 extracellular domain can be acquired. Cultivate the selected hybridoma after culture and by a Hybridoma-SFM culture medium (Invitrogen) by FCS/RPMI1640 culture medium (Invitrogen) 10%, it makes an antibody produce, and refines an antibody using a Prosep-A column (Millipore).

[0096]

(2-3) Production of anti-MCD055 monoclonal antibody

It mixes with Freund's complete adjuvant in equivalent amount, and MCD055 extracellular-domain protein 20mug refined to the abdominal cavity of the BALB/c mouse (a scalpel, 6-week old) is prescribed for the patient. Antigen 20mug is dissolved in a physiological saline after two weeks of first time administration, and a mixed postabdomen cavity is medicated with an equivalent amount with Freund's incomplete adjuvant. It checks in one more week by the method of the above-mentioned (2-2) description of the rise of antibody titer, and the last administration is performed. The abdominal cavity of a mouse is medicated with antigen 100mug, and a spleen is extracted in three days. A lymphocyte is separated from a spleen, it mixes by P3x63-Ag.8.U and 1, and 10:1, and cell fusion is performed using a polyethylene glycol. A hybridoma is chosen by a HAT medium and the hybridoma which is producing the contemptuous glance antibody for one week is screened. a method given in (2-2) — anti-MCD — a well is screened 055 antibody production, and cloning of the well reacted to MCD055 extracellular domain is carried out by limiting dilution, it screens again, and anti-MCD055 monoclonal antibody is acquired.

[0097]

Cultivate a hybridoma by a Hybridoma-SFM culture medium (Invitrogen) after culture by FCS/RPMI1640 culture medium (Invitrogen) 10%, an antibody is made to produce, and an antibody is refined using a Prosep-A column (Millipore).

[0098]

Production of the nature conversion stock of working example 5 MCD the original form of 055 shots

The transformant which reveals MCD055 stably is produced by the following methods. that is,

Into the Jurkat cell (clone E6.1;ATCC) of a 5×10^6 individual, the MCD055 expression plasmid of 20microg, and the Neomycin resistance gene expression plasmid (pcDNA3.1(+);Invitrogen) of 1microg. It introduces by the electroporation method. Electroporation is performed in 300V and 950micro F capacitance using a gene pulsar II system (BIO-RAD). Then, selective culture is performed in the culture medium containing G-418 [0.3mg/ml] (Invitrogen), and a G-418 tolerance clone is obtained. Next, the obtained tolerance clone is analyzed with the flow cytometry described in working example 6, and the clone which has revealed MCD055 is obtained.

[0099]

Working example 6 MCD055 protein manifestation check

The manifestation in the cell membrane of the lymphocyte prepared from a spleen, peripheral blood, etc., the differential white blood count, and the Jurkat T cell which made this protein reveal is checked with flow cytometer. The cell of 10^6 individual which is the experimental target is made suspended to 0.1 ml of 0.1%BSA content PBS, the antibody to the extracellular domain of this invention protein of 1microg is added, and it is made to react at a room temperature for 30 minutes. Carry out centrifugality of this sample and 0.1% BSA content PBS of 100microl is made suspended after 3 times washing by 2-ml 0.1%BSA content PBS, and an FITC sign anti-mouse IgG antibody is 1microg Added, and is made to react to a pan at a room temperature for 30 minutes. After washing 3 times by BSA content PBS 0.1% again, it is re-suspended by 1-ml 0.1%BSA PBS, and the rate of the FITC positive cell contained in the re-suspension is detected and calculated with flow cytometer.

[0100]

IL-2 production inhibiting-activities measurement of a working example 7 MCD055 protein antibody

Seeding of the Jurkat T cell of the 2×10^5 individual which made this invention protein reveal constantly is carried out to 96 hole plate. One evening is cultivated by the culture medium which added the 100 ng(s)/ml doxycycline, Then, the bead (the number of beads: Jurkat cell number =1:1) which carried out the coat of the anti-CD-3 antibody and anti-CD28 antibody ml is added in 5 microg /, it cultivates for 48 hours, and IL-2 contained in a culture supernatant is measured by ELISA. The antibody to this invention protein is added simultaneously with addition of anti-CD-3 antibody-beads and anti-CD28 antibody, and influence on IL-2 production is considered.

[0101]

Phosphorylation inhibition reaction by a working example 8 MCD055 protein antibody

this invention protein into the Jurkat cell of the 1×10^7 individual made to reveal by doxycycline addition Anti-CD-3 antibody beads (the number of beads: Jurkat cell number =1:1), Soluble anti-CD28 antibody After washing once by PBS which adds 5 microg/ml and contains alt.vanadium acid sodium in 10 minutes, Buffer solution for the dissolution of 500microl (1% Triton.) X-100,150mM NaCl and 10mM. Tris-HCl pH7.6,5mM EDTA and 1mM Alt.vanadium acid sodium, 10microg/ml leupeptin, the 10microg/ml aprotinin, and 25microg/ml nitrophenyl p'-guanidino benzoate are added, and it settles in 30-minute ice. In this way, the phosphorylation ERK1/ERK2 is detected by transferring to a PVDF film, after performing SDS electrophoresis to the obtained cell lysate, and performing western blotting using an anti-activity MAPK antibody. The antibody to this invention is added simultaneously with anti-CD-3 antibody-beads and anti-CD28 antibody, and influence on phosphorylation of ERK1/ERK2 is considered.

[0102]

Activity measurement of working example 9 extracellular domain

The peripheral blood lymphocyte (PBMC) prepared from two non-blood relationship persons' donor's (A, B) blood is prepared to 1×10^6 cells/ml by fetal-calf-serum addition RPMI1640 5%. The PBMC suspension of A origin and the PBMC suspension of B origin are added every [$100\text{micro}/1$] on 96 hole plate, and it cultivates for five days within 37 ** and a 5%CO₂ incubator. The MCD055 extracellular domain produced in working example 3 is added 10 microg/ml simultaneously with addition of a lymphocyte. Then, by a culture medium, 20microl

addition of the bromodeoxyuridine (BrdU) prepared to 100microM is done, and it is cultivated for 24 hours. After carrying out centrifugality for 10 minutes, settling 300 g of cells, removing supernatant liquid, adding FixDenat (Roche) of 200microl and settling for 30 minutes. FixDenat is removed, the peroxidase-labeling anti-BrdU reaction mixture of 100microl is added, and it settles at a room temperature for 90 minutes. After washing 3 times by PBS, 100microl addition of the tetramethyl benzidine (TMB) was carried out, and it was made to color. 1M sulfuric acid of 25microl is added 5 to 30 minutes after coloring, a reaction is stopped, and fluorescence degree measurement of OD450nm is performed.

[0103]

[Effect of the Invention]

MCD055 of this invention is the protein which can become the cause to the onset or advance of a disease which an immune function depends unusually.

In development of the drugs for prevention of an autoimmune disease, immune disorder, an allergic disease, the angitis and hepatitis and the inflammatory disease that it is shocking septic, a tumor, etc., or a therapy, it is very useful.

[0104]

Gene mcd055 can be used in the gene therapy as antisense drugs, and protein MCD055 is useful as soluble protein drugs by producing its itself or soluble fragment (an extracellular region and each domain). The antibody which has reactivity in MCD055 or its fragment, and a part of its antibody are useful as an antibody drug article which controls MCD055 function in the living body.

[Layout Table]

<110> Mochida Pharmaceutical Co., Ltd.
<110> Research Association for Biotechnology
<120> A novel immunosuppressive receptor
<130> 47681
<160> 3
<170> PatentIn Ver. 3.1

⟨210⟩ 1

〈211〉 1239

⟨212⟩ DNA

⟨213⟩ *homo sapiens*

400

```

agaaaagct ggcccttcc atccccatg ccacccacag ctccaggagg agagcagtc 1080
ccactatacg ccaacggcgtca tcaccggaaa gggaaagatg aagggttgtt ctactctgtg
gtggatagaa cctccaaagag gagtgcggcc aggttgcgt agtccacgtt ggggagaaag 1140
ttttatcatc tggtggcggagg tgagaatgcgtt gcaggcccg 1200
ttttatcatc tggtggcggagg tgagaatgcgtt gcaggcccg 1239

```

⟨210⟩ 2

〈211〉 413

⟨212⟩ PRT

〈213〉 *homo sapiens*

⟨400⟩ 2

MLPSLGPMNL	WTAVLFLVPC	VGKTVWLYLQ	AWPNPVFEGD	ALTRLCQGKQ	NTPLSQVKEFY	60
RDGKFLHFSK	ENQTLGMAA	TVQSRGQYSC	SGQVMYIPQT	FTQTSETAMV	QVQEFLPPPV	120
LSAIPSPPEPR	BGSVTLRQC	TKLHPLRSAL	RLLFSPFHEDG	HTLQDRGPHP	ELCIPGAEKG	180
DSCGYLWCEVA	PEGGQVQKQS	PQLEVRVQAP	VSPRPVTLHE	GPADPAVGDN	VQLLCEAQRG	240
SPPILYSYFL	DEKIVGNHSA	PCGGTTSLLF	PVSESEQDAGN	YSCAEANSVS	RERSEPKLKS	300
LKGSQLVFLTP	ASNWLPWLP	ASLLGLMVA	AALLVYVRSW	RKAGPLPSQI	PPTAPGGEQC	360
PLYANVHHQK	GKDEGVVYSV	VRHTSERSEA	RSAEFTVGKX	FYHLCGEGMP	AAQ	413

⟨210⟩ 3

〈211〉 1997

〈212〉 DNA

〈213〉 *homo sapiens*

⟨400⟩ 3

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1] It is a figure showing the organization manifestation profile of mcd055 by RT-PCR.

[Translation done.]

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開2004-208583

(P2004-208583A)

(43)公開日 平成16年7月29日(2004.7.29)

(51)Int.Cl.

C12N 15/00
A01K 67/027
C07K 14/705
C07K 16/28
C12N 1/15

F I

C12N 15/00 ZNAA
A01K 67/027
C07K 14/705
C07K 16/28
C12N 1/15

テーマコード(参考)

2G045
4B024
4B063
4B065
4H045

審査請求 未請求 請求項の数 10 O L (全 26 頁) 最終頁に統く

(21)出願番号

特願2002-381558 (P2002-381558)

(22)出願日

平成14年12月27日 (2002.12.27)

(71)出願人

寺田製薬株式会社
東京都新宿区四谷1丁目7番地

(71)出願人

502235522
バイオテクノロジー開発技術研究組合
東京都港区西新橋二丁目3番9号

(74)代理人

100062007

(74)代理人

弁理士 川口 義雄

(74)代理人

10011332

(74)代理人

弁理士 一入 韶夫

(74)代理人

100114188

(72)発明者

弁理士 小野 誠

穢貝 隆夫
茨城県稟敷郡阿見町大字511-12

最終頁に統く

(54)【発明の名稱】新規免疫抑制性受容体

(57)【要約】

【課題】免疫疾患の予防並びに治療に有用な医薬及び方法。

【解決手段】免疫機能の調節に関与する新規な免疫抑制性受容体の遺伝子及び蛋白質と、該蛋白質に対する活性調節剤の効率的な評価方法を提供する。

免疫機能の調節に関与する新規な免疫抑制性受容体の遺伝子 (mcd055)、当該遺伝子にコードされる蛋白質 (MCD055)、及び該DNAを含む組換えベクター、該組換えベクターで形質転換された形質転換細胞、該蛋白質の活性調節物質の検索方法、該蛋白質若しくはその部分ペプチドに反応性を有する抗体を提供する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の(a)または(b)の蛋白質：

(a)配列番号2に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質；

(b)配列番号2のアミノ酸配列においてアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなる免疫抑制性受容体。

【請求項2】

以下の(a)～(c)のいずれかに記載のDNA：

(a)配列番号1に記載の塩基配列からなるDNA；

(b)配列番号1のDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ免疫抑制性受容体をコードするDNA；

(c)請求項1に記載の蛋白質をコードするDNA

【請求項3】

請求項2に記載のDNAを含む組換えベクター。

【請求項4】

請求項3に記載の組換えベクターにより形質転換された形質転換細胞。

【請求項5】

請求項1に記載の蛋白質の発現を抑制するアンチセンス核酸。

【請求項6】

塩基配列が、請求項2に記載のDNAの核酸の全部または一部に相補する配列である、請求項5に記載のアンチセンス核酸。

【請求項7】

請求項1に記載の蛋白質もしくはその部分ペプチドに対する抗体。

【請求項8】

請求項1に記載の蛋白質あるいは該蛋白質を発現している形質転換細胞と被験物質とを接触させることを特徴とする、該蛋白質の活性調節作用を示す物質の検索方法。

【請求項9】

請求項3に記載の組換えベクターまたは請求項4に記載の形質転換細胞と被験物質とを接触させることを特徴とする、請求項2に記載のDNAの発現調節作用を示す物質の検索方法。

30

【請求項10】

mcld055遺伝子組換え非ヒト動物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【技術分野】

本発明は、新規免疫抑制性受容体及びその部分ペプチド、該蛋白質をコードするDNA及びその断片、該DNAを含む組換えベクター、該組換えベクターで形質転換された形質転換細胞、該蛋白質の活性調節作用を示す物質の検索方法、該蛋白質もしくはその部分ペプチドに反応性を有する抗体、遺伝子組換え非ヒト動物に関する。

40

【0002】

【従来の技術】

細胞は他の細胞とコミュニケーションすることによって、細胞の機能や増殖、分化を制御している。細胞接着分子(cellular adhesion molecule)の中でも、生体内のあらゆる免疫反応に深く関与する免疫担当細胞の細胞接着分子は免疫機能そのものを調節する重要なものである。

【0003】

イムノグロブリンMは、免疫系および神経系で非常に多くの蛋白質に見出されており、さらには細胞間認識機構に関与する他の多くの蛋白質においても見出されている。これらの分子を総称してイムノグロブリンスーパーファミリーといふ。イムノグロブリンMは構造を持つ細胞接着分子は数多く知られているが、例えばIg-1受容体、IgP1

50

30. PDGF受容体などが挙げられる。

【0004】

ITIM (Immunoreceptor Tyrosine based Inhibition Motif) は免疫抑制性受容体に共通して認められるモチーフであり、このモチーフ内に含まれるチロシン残基がリン酸化されるγSH2 (SH2-containing Protein tyrosine Phosphatase-1) やδSH2 (SH2-containing inositol Polypeptide Phosphatase-5) が結合することが知られている。このフェヌスファッターゼがSYKなどチロシンキナーゼまたはIP4やPIP3のような脂質を脱リン酸化する。この結果、Ca2+チャネルのCa2+イオン放出、細胞外からのCa2+イオン流入が抑制されることによって風のシグナルを引き起こすと考えられる。

10

【0005】

イムノグロブリンスーパーファミリーに属する免疫抑制性受容体は、CTLA-4、FcγRIIB、Killer cell inhibitor receptor (KIR)、CD22などが知られているが、生体内的複雑な免疫反応、炎症反応の解明のためには、これらに関する新たな免疫抑制性受容体の単離同定が望まれている。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、新規な免疫抑制性受容体とその遺伝子を同定することにより、免疫疾患の予防並びに治療に有用な医薬及び方法を提供するものである。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明は、新規な遺伝子 (mcd055とする)、当該遺伝子にコードされる新規免疫抑制性受容体 (MCD055) に関する。また、該DNAを含む組換えベクター、該組換えベクターで形質転換された形質転換細胞、該蛋白質の活性調節物質の検索方法、該蛋白質若しくはその部分ペプチドに反応性を有する抗体、遺伝子組換え非ヒト動物に関する。

20

【0008】

(核酸)

本発明は、MCD055 (後に詳しく述べる) をコードする遺伝子 mcd055 を提供する。遺伝子 mcd055 とは具体的には、配列番号 2 に示すアミノ酸配列からなる免疫抑制性受容体をコードする DNA のことである。具体例としては配列番号 1 や配列番号 3 に示す cDNA が挙げられるがこれらに限定されることはなく、配列番号 1 や配列番号 3 に示す cDNA のほうが該 cDNA の由来するケノム DNA を含まる。該遺伝子はヒト脳から単離同定することができるが、本明細書に開示された配列を基に、一般的なハイブリダイゼーション等の遺伝子工学的手法を用いたクローニングやホスホアミダイト法などの化学合成的手法により調製される DNA であってもよい。その形態としては cDNA、ケノム DNA の他、化学合成 DNA なども含まれるが、特に制限はない。本発明の DNA は 1 本鎖であっても、それに相補的な配列を有する DNA や RNA と結合して 2 重鎖、3 重鎖を形成してもよい。また、当該 DNA は、ホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) 等の酵素や放射性同位体、蛍光物質、化学発光物質等で標識されてもよい。

30

【0009】

また、mcd055 の塩基配列が提供されれば、これより導かれる RNA の配列や、相補的な DNA やおよび RNA の配列などは一義的に決定されるので、本発明は、本発明の DNA に対応する RNA あるいは本発明の DNA と相補的な配列を有する DNA や RNA もまた提供するものと理解すべきである。本明細書中にありて、「DNA」は「ポリヌクレオチド」と同義である。

40

【0010】

さらに、本発明の DNA には、配列番号 1 に記載の塩基配列からなる DNA とストリンジ

50

エントな条件でハイブリダイズするDNAをも含むものである。

【0011】

配列番号1に記載の塩基配列からなるDNAに対しては、これとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ該DNAにコードされる蛋白質が免疫抑制性受容体であれば、塩基配列のハイエーションが許容される。例えば、いわゆるコドン偏重による同アミノ酸残基をコードする複数のコドンの存在や、種々の人為的処理例えば部位特異的変異導入、変異剤処理によるランダム変異、制限酵素切断によるDNA断片の変異・欠失、連結等により、部分的にDNA配列が変化したものであっても、これらDNA変異体が配列番号1に記載のDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ免疫抑制性受容体をコードするDNAであれば、配列番号1に示したDNA配列との相違に耐えられ、本発明の範囲内のものである。

10

【0012】

上記のDNA変異の程度は、配列番号1に記載のDNA配列と90%以上、好みしくは95%以上、更に好みしくは98%以上の同一性を有するものであれば許容範囲内である。DNA配列の同一性的判断には、BLAST (J. Mol. Evol., Vol. 38: 290-300 (1993)、J. Mol. Biol., Vol. 215: 403-10 (1990)) を用いることができる。また、ハイブリダイズする程度としては、ストリンジェントな条件下、例えばDIG DNA Labeling kit (ロシュ・ケイアグノスティックス社製 Cat. No. 1175033) でアロープをラベルした場合に、例えば32°C、好みしくは37°C、好みしくは42°CのDIG Easy Hybrid液 (ロシュ・ケイアグノスティックス社製 Cat. No. 1603558) 中でハイブリダイズさせ、例えば50°C、好みしくは65°Cの0.5×SSC溶液 (0.1% (w/v) SDSを含む) 中でメンブレンを洗浄する条件 (1×SSCは0.15M NaCl、0.015M クエン酸ナトリウムである) でのササンハイブリダイゼーションで、配列番号1に記載の核膜にハイブリダイズする程度であればよい。

20

【0013】

配列番号1に記載の塩基配列からなるDNAあるいはその部分断片は、自己免疫疾患、免疫不全、アレルギー性疾患、炎症性疾患、腫瘍等本発明の蛋白質が関与する疾患の特異的アロープとして有用であると想される。

30

【0014】

本発明のDNAは、MCD055を大量に生産するために使用することができます。該DNAはまた、酵素等で複数して、細胞における本発明の蛋白質の発現状況を検査するために使用することができます。すなわち、該DNAをアロープとして使用し、細胞における本発明の蛋白質の発現量を、mRNA発現量を指標として確認することにより、本発明の蛋白質の製造に適した細胞やその培養条件を決定することができますほか、本発明の蛋白質が関連する疾患、特に自己免疫疾患、免疫不全、アレルギー性疾患、炎症性疾患、腫瘍等の診断を行うことも可能である。

【0015】

また、本発明のDNAの一部をプライマーとして使用したPCR-RFLP (Restriction fragment length Polymorphism) 法、PCR-SSCP (Single strand conformation Polymorphism) 法、シーケンシング等の方法により、核酸配列上の異常あるいは多形を検出・診断することができます。

40

【0016】

また、本発明のDNAを生体内的細胞に導入し、自己免疫疾患、免疫不全、アレルギー性疾患、炎症性疾患、腫瘍等の発症を予防または治療するための遺伝子治療にも使用することができます。

【0017】

本発明のDNAは、形質転換細胞の調製、さらには該形質転換細胞を用いた組換え蛋白質MCD055の生産方法、あるいはMCD055の発現を特異的に抑制する化合物の探索

50

に大いに有用である。

【0018】

本発明における形質転換細胞は当業者が公知の技術を適用して調製することが可能であり、例えば、市販されあるいは当業者が一般に入手容易な様々なベクターを利用して、適当な宿主細胞へ本発明のDNAを組み入れることが可能である。その際、遺伝子mcd055をクロモーターやエンハンサーに代表される発現制御遺伝子の影響下におくことで、遺伝子mcd055の宿主細胞内での発現を任意にコントロールすることが可能である。この手法は、形質転換された宿主細胞を用いたMCD055の生産において好適に用いられる他、遺伝子mcd055の発現制御機構の研究あるいは該遺伝子の発現を調節し得る物質の探索などにも応用することが可能となる。

【0019】

例えば、任意の被験物質と遺伝子mcd055の一部または全部を含むベクターで形質転換された細胞とを適当な条件下で接触させることで、被験物質の遺伝子mcd055の発現を促進あるいは抑制する作用を有する物質を探索し、あるいは評価を行うことができる。遺伝子mcd055の一部の例としてはmcd055遺伝子の発現制御領域、5'非翻訳領域、翻訳開始部位近傍領域または翻訳領域の一部等を含むDNAが挙げられる。

【0020】

また、本発明であるDNAと公知の方法とを組み合わせて、マウスまたはその他の適当な動物を基にトランスジェニック動物を作製することが出来る。さらに、本発明の遺伝子mcd055を利用すれば、ヒト以外の動物からmcd055に相当する遺伝子を破壊したりやすらノックアウト動物を作製することも可能である。このモデル動物の物理的、生物学的、病理学的及び遺伝子の特徴を分類することにより、本発明に係る遺伝子及び蛋白質の機能を解明することが可能となる。さらに、そのようにして内在性遺伝子が破壊された該動物に本発明のヒトmcd055を導入することにより、ヒトmcd055のみを有するモデル動物を作製することも可能となる。このモデル動物は、該導入されたヒトmcd055をターゲットとした薬剤の開発、評価に有用である。

【0021】

(蛋白質MCD055)

MCD055にコードされる蛋白質MCD055は、配列番号2に示すアミノ酸配列からなる免疫抑制性受容体である。特にそのアミノ酸配列に見られる構造的特徴から、イムノグロブリンスーパーファミリーに属する新規の免疫抑制性受容体であると判断される。

【0022】

MCD055は413アミノ酸からなる分子であり、疊貫通領域を有するI型疊貫通蛋白質である。配列番号2に示すアミノ酸配列の39残基から92残基、132残基から189残基、228残基から285残基の領域にかけ計3個のイムノグロブリンドメイン、2から243残基、及び317から339残基の領域に疊貫通領域、375から381残基の領域にITIMと機能的に同等と推測されるモチーフGVVY8VVが存在する。これら領域の範囲はドメインの定義の仕方により多少の異同を生じ得るが、本質的に同じドメインを意味する限り同義であることは言うまでもない。

【0023】

本発明の蛋白質MCD055は、細胞外ドメインにイムノグロブリンドメインを有し、細胞内ドメインにITIMを有すること、および脾臍、白血球など免疫に直接関与している臓器、細胞で発現していることから、免疫抑制性受容体であると判断される。ここで言う免疫抑制性受容体とは、免疫担当細胞の細胞膜上に発現し、リガンドや抗体などが細胞外ドメインに結合することにより、細胞内活性化シグナル蛋白質のリン酸化抑制を介して、その免疫担当細胞のサイトカイン产生、細胞増殖などの活性を抑制する分子を指す。本発明の蛋白質の細胞外ドメインに対する抗体を作製し、その抗体を用いてフローサイトメーターにより免疫担当細胞における発現を確認することが出来る。また、本発明の蛋白質を発現させたTリンパ球細胞株を樹立し、その細胞に対しサイトカイン产生刺激を与え生サイトカインを測定する系により、サイトカイン产生抑制作用を指標に本発明蛋白質に

10

20

30

40

50

対するアゴニスティック抗体、またはペアチドなどを探索することが出来る。

【0024】

サイトカイン産生刺激として抗CD3刺激を用いたIL-2産生試験系が具体例として挙げられる。細胞内活性化シグナル蛋白質とは例えばERK-1やERK-2が挙げられるが、MCD055を介してリン酸化が調節されている蛋白質であればこれらに限らずされるものではない。本発明の蛋白質に対するリガンドやアゴニスティック抗体による刺激が細胞内に抑制シグナルをもたらすことは、*extremely* cellular signal-*terminated* kinase-1 (ERK-1) のリン酸化抑制により確認できる (Carreno S. The Journal of Immunology Vol. 165 1352-1356 (2000)).

10

【0025】

この様に、MCD055はイムノグロブリンDメインを有する、ITIMを有する等免疫抑制性受容体に認められる特徴を高度に保持している一方、図1に示すように肺、肝臓、心臓、活性化白血球、白血球、脾臓および気管に発現する限りMCD055固有の発現プロファイルを示すなどの特徴を有する。このことから、MCD055は、免疫機能の調節において、他の免疫抑制性受容体にはない特徴的な役割を果たしていることが強く推認される。従って、MCD055を標的とした医薬化合物は、従来にはない特徴を備えた医薬となり得るものと期待される。

【0026】

なお、免疫抑制性受容体である限り、配列番号2に示す蛋白質のアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が置換、欠失、およびノモレクレートは付加したアミノ酸配列からなるボリペチドあるいは蛋白質も本発明の範囲内である。

20

【0027】

蛋白質の構成要素となるアミノ酸残基側鎖は、疎水性、電荷、大きさなどに応じてそれぞれ異なるが、実質的に蛋白質全体の3次元構造(立体構造とも言う)に影響を与えない限り意味のある保存性の高い残基の関係が知られている。例えば、アミノ酸残基の置換については、グリシン(Gly)とアロリン(Pro)、Glyとアラニン(Ala)またはバリン(Val)、ロイシン(Leu)とイソロイシン(Ile)、グルタミン酸(Glu)とグルタミン(Gln)、アスパラギン酸(Asp)とアスパラギン(Asn)、システイン(Cys)とスレオニン(Thr)、Thrとセリン(Ser)またはAla、リシン(Lys)とアルギニン(Arg)、等が挙げられる。また、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、メチオニン(Met)、フェニルアラニン(Phe)、トリプトファン(Trp)、Gly、Cysは、共に非極性アミノ酸として、Ser、Thr、チロシン(Tyr)、Asn、Glnが挙げられる。極性アミノ酸としては、AspおよびGluが挙げられる。塩基性アミノ酸としてはLys、Arg、ヒスチジン(His)が挙げられる。また、上述の意味の保存性を複数な場合でも、なほその蛋白質の本質的な機能を失わない変異も当業者に多く知られている。さらに、異なる生物種間に保存される同種の蛋白質が、残りのアミノ酸が集中あるいは分散して欠失あるいは導入されていてもなお本質的な機能を保持している例も多く認められている。

30

【0028】

従って、配列番号2に示したアミノ酸配列上の置換、挿入、欠失等による変異蛋白質であっても、それが免疫抑制性受容体であれば、これらは本発明の範囲内にあるものと言えようとすることができる。免疫抑制性受容体であるとは、換言すれば本発明のMCD055蛋白質と同等の機能を有することである。同等の機能を有するとは、細胞内活性化シグナル蛋白質のリン酸化抑制活性、サイトカイン産生抑制活性、細胞増殖抑制活性から派生される少なくとも一つの活性を保持していることを言う。

40

【0029】

このようなアミノ酸の変異は、遺伝子多型等によって生ずる変異の様に自然界において認められる他、当業者に公知の方法、例えばNTGなどの変異誘発剤を用いた突然変異誘発

50

法や種々の組換伝子手法を用いた部位特異的変異法を利用して、人為的に行なうことができる。アミノ酸の変異部位および個数は、変異蛋白質が免疫抑制性受容体である限り特に制限はないが、変異個数は通常數十アミノ酸以内、好みしくは10アミノ酸以内、より好みしくは1もしくは数個以内である。

【0030】

また本発明では、MCD055を上述のような全てのドメイン構造を有する分子全体として理解できるほか、特徴的なドメイン、特にリガンドとの結合能を担うドメインを保持した部分ペアチドとして理解することもできる。膜貫通型蛋白質の中には、リガンド結合部位を含む部分断片が、特徴的な立体構造を保持したまま他のドメインから切り離されるなどして、遊離の（あるいは可溶化、可溶型とも言われる）部分ペアチドとして存在し得るものがあることが、以前より報告されている。この様な部分ペアチドは、依然として特異的なリガンドとの結合能を保持していることから、これを用いて該蛋白質への結合能を有する化合物の探索が可能となる。MCD055における部分ペアチドも、かかる意味においてそのリガンド結合能を有する限り、実質的には本発明と同等の物質であると理解すべきである。また、可溶型MCD055はMCD055（細胞膜上にある膜貫通型）との競合により免疫反応を調節したり、可溶型MCD055自体がリガンドとして機能し、何らかの受容体に結合し、免疫反応を調節する活性を発揮する可能性も考えられる。このような活性を有する部分ペアチドも本発明の範囲内の中のものである。可溶型MCD055の免疫反応を調節する活性は例えば実施例9に示す混合リンパ球反応により検出することが可能である。免疫反応を調節する活性とは、具体的にはサイトカイン産生調節活性およびまたは細胞増殖調節活性のことである。

【0031】

部分ペアチドの好みしい性質としては、例えば細胞外ドメイン（配列番号2の25～316a.a.）、または細胞内ドメイン（配列番号2の340～413a.a.）のいずれかを含むペアチドが挙げられる。配列番号2のアミノ酸配列の317番目から319番目のアミノ酸残基付近に膜貫通領域の存在が予測されている（膜貫通予測プログラムSOSUを用いた場合）。ドメインをどこまでのアミノ酸残基で区切るかは、使用するドメインの予測方法により多少前後することがあるが、そのような差異は許容されるべきものである。リガンド結合能または免疫反応を調節する活性を有するという観点では、少なくともイムノグロブリンドメインを含むことが好みしい。また、シグナル伝達機能を有するという観点では、少なくとも細胞内ドメインのITIMを含むことが好みしい。少なくとも一つの機能ドメインを含む限り、他のドメインの全部または一部が連結していても良いし、他の蛋白質やペアチドとの結合蛋白質となっていても良い。

【0032】

機能ドメインとは、リガンド結合能、免疫反応を調節する活性またはシグナル伝達機能を保持した部分ペアチドのことである。融合蛋白質がMCD055または可溶型MCD055としてのリガンド結合能、免疫反応を調節する活性またはシグナル伝達機能から選ばれる少なくとも一つの活性を有する限りにおいて、MCD055部分ペアチドに連結される他のボリペアチドには特に制限はない。このような融合蛋白質の好みしい一例は、イムノグロブリンのFcフラグメントとの融合蛋白質やヒスチジンタグとの融合蛋白質であるがこれらに限定されるものではない。Fc断片はIgGの場合、ヒンジ領域、CH2領域およびCH3領域からなる。Fc断片の部分（例えばヒンジ領域、CH2領域、CH3領域もしくはCH4領域の各領域の単独または任意の組合せ）も使用可能である。この場合のイムノグロブリンは、由来未記載の種は何れでもよいが、ヒト由来のものが好みしい。また、クラス及びサブクラスに関しても必ずしも限定されず、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgM、IgEおよびIgD等の何れもが使用可能であるが、例えば、IgGが好みしい例である。

【0033】

またシグナル配列を有する蛋白質ではシグナル配列が切断されたものが成熟蛋白として機能している場合もある。よって本発明の蛋白質からシグナル配列が除かれた成熟ペアチド

も、実質的には本明と同等の物質であると理解すべきである。MCD055の場合、配列番号2に示されるアミノ酸配列の2番目から24番目のアミノ酸残基付近にシグナル配列の存在を予測している（*胰島素測定法プログラム SOSU1*を用いた場合）。シグナルペプチド領域の範囲は予測プログラムにより多少の異同を生じ得るし、実験的に作製した蛋白質においてもシグナルペプチドの除かれ方に多様性が生じることがあるが、MCD055蛋白質として機能的に同等である限り、本明と同等の物質であると理解されるべきである。

[0034]

本発明の蛋白質またはその部分ペプチドは、該蛋白質の活性を調節する物質の探索に使用することが出来る。探索を通じて得られる化合物等は、本発明の蛋白質が関連する疾患、例えば自己免疫疾患、免疫不全、アレルギー性疾患、炎症性疾患、癌等に対する有効な治療法または予防法となることが期待される。

[0.035]

100

本発明はさらにMCD055に結合する抗体を提供する。本発明の抗体は、MCD055全体あるいはその部分ペプチドを抗原として特異的に認識する抗体であり、モノクローナル抗体及び/またはポリクローナル抗体が含まれる。また、免疫グロブリンの構造、物理化学的性質や免疫学的性質とともに分類される5つのクラス（IgG、IgA、IgM、IgD、IgE）、あるいはH鎖のタイプによるサブクラスのいずれに属するものであってもよい。さらには、免疫グロブリンを例えばペプシンで分解したときのF_{ab'}、ペプシンで分解したときのF_{ab}などのフラグメントであっても、またキメラ抗体やヒト化抗体であってもよい。またMCD055あるいはその部分ペプチドを特異的に認識するのみなく、MCD055の活性を調節する機能を有する抗体も本発明に含まれる。MCD055の活性を調節する機能を有する抗体とは、例えはMCD055とリガンドの結合を阻害する中和抗体が挙げられる。これらの抗体は、MCD055の研究的あるいは臨床的な検出等に用いられる。

[0036]

(アンチセンス核酸)

本発明は、生体内にありて核酸レベルでのMCD055生合成を抑制することのできる、いわゆるアンチセンス核酸を提供する。かかるアンチセンス核酸は、MCD055をコードするmRNAを作り出すのに必要なケノム領域からP1-P2-mRNAへの転写段階、P3-P4-mRNAから成熟mRNAへのアロセッシング段階、核膜通過段階、蛋白への翻訳段階のいずれかで、遺伝子構造を担うDNAもしくはRNAに結合し、遺伝情報の伝達の正常な流れに影響を与えて蛋白質の発現を調節するものを意味し、遺伝子mCD055の核酸配列の全体あるいはいずれかの部分に相補性を有する配列からなるものであってもよい。好ましくは、配列番号1または配列番号3に記載の核酸配列に相当あるいは相補性を有する配列から成る核酸(DNA、RNAを含む)である。また、ケノム領域から転写されるmRNAがインソリン構造あるいは5'-末端や3'-末端に非翻訳領域を含む形であるときは、かかる非翻訳部分の配列に相当あるいは相補性を有するアンチセンス核酸も本発明のアンチセンス核酸と同様の機能を有するものとなる。

〔 0 0 3 7 〕

[0038]

また本発明では、一般的には、システム・ループを形成しているmRNAのループ部分にハイブリダイズするような塩基配列、すなわちシステム・ループを形成している領域の塩基配列に相補的な塩基配列をもつアンチセンス核酸が好適である。あるいは、翻訳開始コドン付近、リボソーム結合部位、キャッピング部位、スライス部位に結合するようなアンチセンス核酸、すなわちこれらの部位の配列に相補的な配列を有するアンチセンス核酸も、一般に高い発現抑制効果が期待できる点で好ましい。

【0039】

このようなアンチセンス核酸を細胞内に取り込ませ、効率的に作用させるためには、本発明のアンチセンス核酸の鎖長は15塩基以上30塩基以下、好ましくは15塩基以上25塩基以下、より好ましくは18塩基以上22塩基以下の塩基数からなる塩基配列からなるものが好適である。

【0040】

本発明のアンチセンス核酸の発現抑制効果は、公知の手法、例えば本発明の遺伝子の発現抑制領域、5'非翻訳領域、翻訳開始部位近傍領域または翻訳領域の一部等を含むDNAとルシフェラーゼ等のレポーター遺伝子を連結した発現プラスミドを作製し、In Vitro transcription反応(アロメガ社: Ribomax System等)とIn Vitro translation反応(アロメガ社: Rabbit Reticulocyte Lysate System等)を併用する系のよな本発明の遺伝子が転写または翻訳される環境下で被験物質を系に添加し、該レポーター遺伝子の発現量を測定することにより評価することができます。

20

【0041】

本発明のアンチセンス核酸は、生体内におけるMCD055の発現を抑制することができるので、MCD055が関連する疾患の予防・治療剤として有用である。

【0042】

【発明の実施の形態】

(核酸)

本発明のDNAをDNAライブラリーから得る例としては、過当なケノムDNAライブラリーやcDNAライブラリーや、ハイブリダイゼーションによるスクリーニング法や、抗体を用いたイムノスクリーニング法等でスクリーニングし、目的のDNAを有するクローニングを増殖させ、そこから制限酵素等を用いて切り出す方法がある。ハイブリダイゼーション法によるスクリーニングは、配列番号1に記載の塩基配列もしくはその一部を有するDNAを³²P等ラベルしてプローフとし、任意のcDNAライブラリーに対して、公知の方法で(例えば、Maniatis T.等、Molecular Cloning a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982年)行なうことができる。イムノスクリーニング法で用いる抗体は、後述する本発明の抗体を使用することができます。本発明の新規DNAはまた、ケノムDNAライブラリーもしくはcDNAライブラリーを録型とするPCR(Polymerase Chain Reaction)によっても得る事ができる。PCRは、配列番号1に記載の塩基配列をもとに、センスプライマー、アンチセンスプライマーを作製し、任意のDNAライブラリーに対し、公知の方法(例えばMichtael A. I.等、PCR Protocols, a Guide to Methods and Applications, Academic Press, 1990年参考)等を行って、本発明のDNAを得る事もできる。上記各種方法で使用するDNAライブラリーは、本発明のDNAを有するDNAライブラリーを造りして使用する。当該DNAライブラリーは、本発明のDNAを有するライブラリーであれば、いかなるものも使用可能であり、市販のDNAライブラリーを使用したり、本発明のDNAを有する細胞からcDNAライブラリーを作製するのに適した細胞を選び、公知の方法(J. Sambrook等、Molecular Cloning, a Laboratory Manual 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989年参考)に従って、cDNAライブラリーを作製し、利用

30

40

50

することができる。

【0043】

また、本明細書に開示された配列を基にホスホアミダイト法などの化学合成的手法により調製することも可能である。

【0044】

本発明のDNAを含む組換えベクターは、環状、直鎖状等いかなる形態のものであってもよい。かかる組換えベクターは、本発明のDNAの全部または一部に加え、必要ならば他の塩基配列を有しているともよい。一部とは例えは本発明の蛋白質の部分ペプチドをコードするDNAである。他の塩基配列とは、エンハンサーの配列、プロモーターの配列、リボソーム結合配列、コピー数の増幅を目的として使用される塩基配列、シグナルペプチドをコードする塩基配列、他のポリペプチドをコードする塩基配列、ポリA付加配列、スライシング配列、複製開始点、選択マーカーとなる遺伝子の塩基配列等のことである。本発明の組換えベクターの好みの一例は、発現ベクターである。

10

【0045】

遺伝子組換えに際しては、適当な合成DNAアグリマーを用いて翻訳開始コドンや翻訳終止コドンを本発明のDNAに付加したり、あるいは塩基配列内に適当な制限酵素切断配列を新たに発生させあるいは消失させることも可能である。これらは当業者が通常行う作業の範囲内であり、本発明のDNAを基に任意かつ容易に加工することができる。

【0046】

また本発明のDNAを保持するベクターは、使用する宿主に応じて適当なベクターを選択して使用すればよく、プラスミドの他にパクテリオファージ、パキュロウイルス、レトロウイルス、ワクシニアウイルス等の種々のウイルスを用いることも可能であり、特に制限はない。

20

【0047】

本発明の遺伝子の発現は、該遺伝子固有のアプロモーター配列の制御下に発現させることができる。かかる発現系を用いれば、本発明の遺伝子の転写を促進あるいは抑制する物質の探索がより有利に行なえる。あるいは、本発明の遺伝子の上流に別の適当な発現アプロモーターを該遺伝子固有のアプロモーター配列に接続あるいは置き換えて使用することもできる。この場合に使用するアプロモーターは、宿主及び発現の目的に応じて適宜選択すればよく、例えは宿主が大腸菌である場合には、T7アプロモーター、lacZアプロモーター、セトPアプロモーター、スループロモーターなどが、宿主が酵母である場合にはPHO5アプロモーター、GAPアプロモーター、ADHアプロモーター等が、宿主が動物細胞である場合にはSV40由来アプロモーター、レトロウイルスアプロモーター、延長因子1α(Elongation Factor 1α)アプロモーター等を例示できるが、当然ながらこれらには限定されない。

30

【0048】

DNAをベクターに導入する方法は公知である (J. Sambrook等、Molecular Cloning: a Laboratory Manual 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, ニューヨーク (New York), 1989年、参照)。すなわち、DNAとベクターをそれぞれ適当な制限酵素で消化し、得られたそれぞれの断片を、DNAリガーゼを用いてライゲーションさせればよい。

40

【0049】

(蛋白質)

本発明の蛋白質は、該蛋白質を発現している細胞や組織から調製することができ、またペプチド合成機(例えは、ペプチドシンセサイザー433A型、アフライドバイオシステムズ・ジャパン株式会社製)を使用した化学合成法でも、また原核生物あるいは真核生物から選択される適当な宿主細胞を用いた組換え方法によつても調製することができる。しかしながら、その純度の面から遺伝子工学的な手法による生産ならびに組換え型蛋白質が好み)。

50

【0050】

前項の組換えベクターを用いて形質転換させる宿主細胞には特に制限はなく、E. coli、B. subtilisあるいはS. cerevisiaeに代表される遺伝子工学手法において利用可能な下等細胞、昆虫細胞、COS7細胞、CHO細胞、HeLa細胞に代表される動物細胞など多くの細胞が、本発明に対しても利用可能である。

【0051】

本発明の形質転換細胞は、適当な宿主細胞を本発明の組換えベクターにより形質転換させることで得ることができます。前項の組換えベクターを宿主細胞に導入する方法としては、エレクトロポレーション法、アロトフラスト法、アルカリ金属法、リン酸カルシウム沈澱法、DEAEキストララン法、マイクロインジェクション法、ウイルス粒子を用いる方法等の公知方法（実験医学臨時增刊、遺伝子工学ハンドブック1991年3月20日発行、羊土社、參照）があるが、いずれの方法を用いても構わぬ。

10

【0052】

当該蛋白質を遺伝子工学的に生産するには、上述の形質転換細胞を培養して培養混合物を回収し、当該蛋白質を精製する。形質転換細胞の培養は、一般的な方法で行なうことができます。形質転換細胞の培養については各種の収書（例、「微生物実験法」社団法人日本化学会編、株式会社東京化学生産、1992年）があるので、それらを参考にして行なうことができます。

【0053】

培養混合物から本発明の蛋白質を精製する方法としては、蛋白質の精製に通常使用される方法の中から適切な方法を適宜選択して行なうことができる。すなわち、塩析法、限外濾過法、等電点沈澱法、ケルム法、電気泳動法、イオン交換クロマトグラフィー、疏水性クロマトグラフィーや抗体クロマトグラフィー等の各種アフィニティクロマトグラフィー、クロマトフォーカシング法、吸着クロマトグラフィーおよび逆相クロマトグラフィー等、通常使用され得る方法の中から適切な方法を適宜選択し、必要によりHPLCシステム等を使用して適当な順序で精製を行なえは良い。

20

【0054】

また、本発明の蛋白質を他の蛋白質やタケ（例、グルタチオンSトランスフェラーゼ、アロテイシンA、ヘキサビスチジング、FLAGタグ等の他）との融合蛋白質として発現させることも可能である。発現させた融合型は、適当なアロテアーゼ（例、トロンビン、エンテロカイノース等の他）を用いて切り出すことが可能であり、とまとして蛋白質の調製をより有利に行なうことが可能となる。本発明の蛋白質の精製は当業者に一般的な手法を適宜組み合わせて行なえばよく、特に融合蛋白質の形態で発現させたときは、その形態に特徴的な精製法を採用することが好ましい。

30

【0055】

また、組換えDNA分子を利用して無細胞系の合成方法（J. Bamberg, ed. et al. : Molecular Cloning 2nd ed. (1989年)）で得る方法も、遺伝子工学的に生産する方法の1つである。

【0056】

この後で本発明の蛋白質は、それ単独の形態でも異種の蛋白質との融合蛋白質の形態でも調製することができるが、これらのみに制限はされるものではなく、本発明の蛋白質を更に種々の形態へと変換させることも可能である。例えば、蛋白質に対する種々の化学修飾、ポリエチレンギリコール等の高分子との結合、不溶性担体への結合など、当業者に知られている多種の手法による加工が考えられる。また、用いる宿主によつては糖鎖の付加の有無あるいはその程度にも違いが認められる。かかる場合にあっても、免疫抑制性受容体として機能する限りにおいて、なお、本発明の思想下にあるといふべきである。

40

【0057】

本発明の蛋白質は、抗体を作製するための抗原として使用し、あるいは該蛋白質に結合する物質や該蛋白の活性を調節する物質のスクリーニングに使用することができ、有用である。

50

【0058】

本発明のMCD055は、上述のような形質転換細胞、特に動物細胞を培養することにより、その細胞表面に目的分子を高発現させることができ可能である。一方、MCD055の細胞外領域蛋白質フラグメントなどの適当な断片を可溶性蛋白質として製造する場合には、当該細胞外領域あるいは各ドメインをコードするDNAを用いて上述のように形質転換細胞を調製し、外形質転換細胞を培養することにより培養上清中に分泌させることにより製造することができます。

【0059】

一方、MCD055が形質転換細胞のペリラズムまたは細胞質内に存在する場合は、適当な細胞液に懸濁した細胞に対して、例えば超音波処理、凍結融解処理、あるいはリソソーム処理などを用いて細胞壁および/または細胞膜を破壊した後、透心分離やろ過などの方法で本発明の蛋白質を含有する粗画分を得、さらに該粗画分を適当な界面活性剤を用いて可溶化して粗溶液を調製する。そして、当該粗溶液から定法により目的蛋白質を単離、精製することができます。

【0060】

(mcd055遺伝子組換え非ヒト動物)

本発明は、mcd055遺伝子組換え非ヒト動物を提供する。mcd055遺伝子組換え非ヒト動物には、トランスジェニック非ヒト動物およびノックアウト非ヒト動物が含まれる。mcd055遺伝子組換え非ヒト動物は、本発明の蛋白質の発現の程度、発現時期、発現部位等が制御されることを特徴とする。非ヒト動物としては、例えばウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、マウス、ウマ、ニワトリなどが挙げられるがこれらに限定されるものではない。非ヒト動物の中でも非ヒト乳動物が好ましい。

【0061】

本発明の遺伝子mcd055を用いれば、トランスジェニック非ヒト動物を作製することができます。該トランスジェニック非ヒト動物は、トランスジェニック動物の製造において通常使用されるような定法(初、発生工学実験マニュアル、講談社サイエンティフィック発行、勝木元也編、野村連次監修、1987年)に従って作製することができます。すなわち、本発明の遺伝子または組換えベクターを非ヒト動物の受精卵に導入し、この受精卵を個体へと発生させ、体細胞のゲノム中に導入遺伝子が組み込まれた個体を選別する。

【0062】

具体的には、例えば、トランスジェニックマウスの場合には、正常C57BL/6Jマウスから取得した前筋期受精卵にmcd055遺伝子が発現可能のように構築されたDNAを直接注入する。より具体的には、適切なプロモーターの下流にmcd055遺伝子を接続して導入したコンストラクトを作製し、その後必要であれば原核生物由来の配列を可能な限り除去した直鎖状DNAを得て、これを前筋期受精卵前筋に微細なガラス針を用いて直接注入する。

【0063】

該受精卵を仮親となる別の偽妊娠マウスの子宮に移植する。偽妊娠マウスは一般的にICR雄マウスを、輸管を切断または結した雌マウスと交配して作製する。移植由来の仔の組織よりゲノムDNAを抽出し、PCR法またはサザンブロッティング法にてMCD055遺伝子の導入の有無を確認しトランスジェニックマウスを得る。

【0064】

また、mcd055(またはmcd055のマウス相向遺伝子)の塩基配列に基づいて、いわゆる「ノックアウトマウス」を作製することができます。本発明における「ノックアウトマウス」とは、本発明のマウス由来の蛋白質をコードする内在性遺伝子がノックアウト(不活性化)されたマウスであり、例えば相向組換えを応用したボジティブネガティブレセクション法(米国特許第5,464,764、7,644号公報、同5,487,992号公報、同5,627,059号公報、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. Vol. 86, 8932-8935, 1989, Nature. Vol. 342, 435-438 50

1989などを用いて作製することができ、このようなノックアウトマウスも本発明の一態様である。また、近年マウスに行われているランダムな動植物の遺伝子破壊方法によっても結果的に本遺伝子の破壊動物が得られる場合もある。本遺伝子の破壊が明らかとなった動物は、その破壊が本遺伝子の明確な目的を持って行われたか否かに問わらずその遺伝子の破壊が判明した時点で本発明の一態様である。

【0065】

または、最近、中・大動物においても核移植によりクローリン動物の作製が可能となった。これに伴い本技術を用いたトランジェニックおよびノックアウト動物の作製も実験に行われるようになった。すなわち体細胞、あるいは生殖系の細胞に対し mcd055 (または各動物における mcd055 の相同遺伝子) の遺伝子配列に基づいて、ES 細胞に対して行うと同様に相同組換を行い、得られた細胞から核を得て、その核を用いてクローリン動物を得ることができる。該動物は mcd055 (または各動物における mcd055 の相同遺伝子) が失われたノックアウト動物である。または、上述の方法と同様、任意の動物の任意の細胞に mcd055 (または各動物における mcd055 の相同遺伝子) 遺伝子を導入し、その核を用いてクローリン動物を得る事によりトランジェニック動物を作製する事も可能である。このようなノックアウト非ヒト動物およびトランジェニック非ヒト動物はその種に問わらず本発明の一態様である。

【0066】

(抗体)

本発明の抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体いずれも公知方法を参考にして得ることができる (例えば、免疫実験操作法、日本免疫学会編、日本免疫学会発行、参考)。以下に簡単に説明する。

【0067】

当該新規抗体を得るには、まず動物に、免疫抗原として本発明の蛋白質を必要に応じてフロイントの完全アジュvant (FCA) や不完全アジュvant (IFA) 等の適切なアジュvantとともに接種し、必要があれば 2 ~ 4 週間の間隔で追加免疫する。追加免疫後、採血を行い、抗血清を得る。抗原として用いる本発明の蛋白質は、それが抗体の作製に使用しようる構造度のものであればいかなる方法で得られたものであってもよい。本発明の蛋白質の部分ポリペプチドも免疫抗原として好適に使用しよう。免疫抗原として使用するポリペプチドが、低分子のポリペプチド、すなわち約 10 ~ 20 アミノ酸からなるポリペプチドである場合には、それをキーホールリソバットヘモシクリアイン (KLH) 等のキャリアと結合させて抗原として使用すればよい。免疫する動物はいかなるものであっても良いが、好ましくは通常当業者で免疫学的な実験に使用されるラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ウマ、ニワトリ、ヤギ、アバ、ウシ等から、目的の抗体を产生しようる動物種を選択して使用することが好ましい。

【0068】

ポリクローナル抗体は、得られた抗血清を精製することによって得る事が出来る。精製は、塩析、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティーコロマトグラフィー等の公知方法を適宜組み合わせて行えは良い。

【0069】

モノクローナル抗体を得るには以下のように行う。すなわち、免疫した動物から脾細胞もしくはリンパ球等の抗体産生細胞を採取し、ポリエチレンクリコール、センダイウイルス、電気バルス等を用いる公知方法によって、ミクローマ起胞株等と融合し、ハイブリドーマを作製する。その後、本発明の蛋白質に結合する抗体を産生しているクローリンを選択して培養し、その選択されたクローリンの培養上清を精製することによって得れば良い。精製は、塩析、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティーコロマトグラフィー等の公知方法を適宜組み合わせて用いれば良い。

【0070】

また、遺伝子工学的な方法を用いても当該新規抗体が得られる。例えば、本発明蛋白質またはその部分ポリペプチドで免疫した動物の脾細胞、リンパ球あるいは、本発明蛋白質ま

10

20

30

40

50

たはその部分ポリペチドに対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマからmRNAを採取し、これをもとにcDNAライブラリーを作製する。抗原と反応する抗体を産生しているクローニングをスクリーニングし、得られたクローニングを培養し、培養混合物から公知方法を組み合わせて目的とする抗体を精製することができる。抗体を治療に使用する場合には、免疫原性の点からヒト化抗体が好ましい。ヒト化抗体は、免疫系をヒトのものと入れ替えたマウス(例Na⁺、Genet. 15:146-156(1997))を免疫することにより調製することができる。また、モノクローナル抗体の超可変領域を用いて遺伝子工学的に調製することもできる(Methode in Enzymol 203:99-121(1991))。

【00071】

(アンチセンス核酸)

アンチセンス核酸は、公知方法で製造することができる(例えは、Stanley T. CrookeおよびBernard Lebleu編、in *Antisense Research and Applications*、CRC出版、フロリダ、1993年)。天然のDNAやRNAであれば、化学合成機を使用して合成し、あるいはMD055を鉄型としてPCR法により本発明のアンチセンス核酸を得ることができます。また、メルフィスフォネット型やフォスフォロコエート型等、誘導体の中には化学合成機(たとえばアフライドバイオシステムズ・ジャパン株式会社製、Expressedit Mode I 8909)を使用して合成できるものもある。この場合には、化学合成機に添付されたマニュアルに従って操作を行い、得られた合成功物を、逆相クロマトグラフィー等を用いたHPLC法により精製することによっても、アンチセンス核酸を得ることができます。

【00072】

本発明のDNAやアンチセンス核酸を診断用のプローブとして使用する場合には、これらを公知の方法に従い、ラジオアイソトープ、酵素、蛍光物質、あるいは発光物質等で標識する。次に、検体からDNAもしくはmRNAを公知方法で調製し、これに被標識質として、前記標識プローブを加えて反応させた後、洗浄して未反応の前記標識プローブを除去する。被標識物質中に、遺伝子mcd055もしくはRNAが含まれていれば、当該アンチセンス核酸はそれらと結合する。結合形成の有無は、標識した酵素、蛍光物質、発光物質、あるいは放射性同位元素等による発光、蛍光、放射能等を指標として知ることができます。

【00073】

本発明のDNA、アンチセンス核酸または組換えベクターを医薬用途に使用する場合には、医薬品として使用するに適した純度のものを、薬理学的に許容されうる使用方法で使用することが好ましい。

【00074】

本発明のDNA、アンチセンス核酸または組換えベクターは、これらを直接適当な溶液に溶解もしくは懸濁して使用してもよいし、リポソーム中に封入したり、適当なベクターに組み込んだ形にして使用してもよい。また、必要に応じて、薬理学的に許容され得る補助成分を添加し、注射剤、錠剤、カプセル剤、点滴剤、クリーム剤、座剤、噴霧剤、パッパー剤等適当な剤型にして使用してもよい。薬理学的に許容され得る補助成分とは、溶媒、基剤、安定化剤、防腐剤、溶解剤、賦形剤、緩衝剤等のことである。

【00075】

本発明のDNA、アンチセンス核酸または組換えベクターは、上述のような剤型とした場合、患者の年齢や、性別、疾患の種類、程度に応じて、その投与方法、その投与量を設定して使用することができる。すなわち、病態を改善するのに適した量を、経口投与、あるいは、吸入、経皮投与、点眼、耳内投与、関節内投与、直腸投与、静脈内投与、局所投与、筋肉内投与、皮下投与、腹腔内投与等から適当な方法を選んで投与すればよい。

【00076】

(スクリーニング方法)

本発明は、本発明の蛋白質、該蛋白質を発現している形質転換細胞、本発明のDNA、該

10

20

30

40

50

DNAを含む組換えベクター、該組換えベクターで形質転換された形質転換細胞またはmcd055遺伝子組換え非ヒト動物を用いることを特徴とし、本発明の蛋白質の懸触または発現を調節する物質をスクリーニングする方法に関する。より具体的には、(1)被験物質を用意し、本発明の蛋白質または該蛋白質を発現している形質転換細胞に該被験物質を接触させ、該被験物質が本発明の蛋白質の活性を調節する作用を有するかどうかを評価することからなる方法(2)被験物質を用意し、本発明のDNAを含む組換えベクターまたは該組換えベクターで形質転換された形質転換細胞に該被験物質を接触させ、該被験物質がmcd055遺伝子の発現を調節する作用を有するかどうかを評価することからなる方法などが挙げられる。(1)の例としては、実施例7、8または9に示す系にみて、被験物質存在下/非存在下における本発明の蛋白質の活性を測定し、非存在下に比べて存在下において本発明の蛋白質の活性を増加または減少させる被験物質を選択する方法が挙げられる。(2)の例としては、mcd055遺伝子の発現制御領域、5'非翻訳領域、翻訳開始部位近傍領域または翻訳領域の一部等を含むDNAとルシフェラーゼ等のレポーター遺伝子を組みした組換えベクターを作製し、本発明の遺伝子が転写または翻訳される環境下で該レポーター遺伝子の発現量を被験物質の存在下/非存在下で測定し、被験物質の転写促進活性または転写抑制活性を確認する方法が挙げられる。本発明のスクリーニング方法は、本発明の蛋白質、該蛋白質を発現している形質転換細胞、本発明のDNA、該DNAを含む組換えベクター、該組換えベクターで形質転換された形質転換細胞またはmcd055遺伝子組換え非ヒト動物と被験物質を接触させる工程、被験物質添加群と被験物質無添加群における本発明の蛋白質の活性または本発明のDNAの発現レベルに差があるかどうかを検出す工程、差が認められた被験物質を本発明の蛋白質の活性調節物質または本発明のDNAの発現調節物質として選択する工程を含み得る。本発明の蛋白質の活性を調節する作用を示す物質とは、MCD055蛋白質の活性を模倣(ミミック)しない増強する(アゴニスト)、あるいは阻害する(アンタゴニスト)作用を有する物質のいずれでも良い。本発明のDNAの発現調節作用を示す物質とは、遺伝子mcd055の発現を促進あるいは抑制する作用を有する物質のいずれでもよい。被験物質が本発明の蛋白質の活性調節作用または本発明のDNAの発現調節作用を示すかどうかは、蛋白質の活性を確認できる系またはDNAの発現を確認できる系に被験物質を添加した場合と無添加の場合の蛋白質の活性またはDNAの発現レベルに差があるかどうかを調べればよい。DNAの発現レベルとは、mcd055遺伝子のmRNAの発現強度、蛋白質の発現強度のいずれにより検出してても良い。また、mcd055遺伝子またはMCD055蛋白質自身の発現レベルはなく、代替としてレポーター遺伝子の発現レベルを検出しても良い。レポーター・アッセイ系は、試験したいたい遺伝子の発現制御領域の下流に配置したレポーター遺伝子の発現量を指標として、該発現制御領域に作用する物質をスクリーニングするアッセイ系をいう。発現制御領域としては、アロモーター、エンハンサー、通常アロモーター領域に見られるCATホックス、TATAボックス等を例示することができます。またレポーター遺伝子としては、CAT(cat or hamilton cat or cat-aSe)遺伝子、ルシフェラーゼ(luciferase)遺伝子、β-ガラクトシダーゼ(β-galactosidase)遺伝子等を利用することができます。本発明の遺伝子の発現制御領域や5'非翻訳領域は公知の方法で取得することができるので(新細胞工学実験アートコール(秀澤社)、1993年)、阻害(または抑制)する作用を有する、あるいは増強(または促進)する作用を有するとは、蛋白質の活性またはDNAの発現レベルの測定値が、被験物質添加群と、被験物質無添加群との間に差があることをいう。たとえば、下記の式で計算される阻害(または抑制)率あるいは増強(または促進)率が10%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは50%以上、更に好ましくは70%以上、特に好ましくは90%以上であることをいう。

【0077】

阻害(または抑制)率あるいは増強(または促進)率 = (被験物質無添加群の測定値 - 被験物質添加群の測定値)の絶対値 / 無添加群の測定値 × 100

【0078】

10

20

30

40

50

ここで、阻害または増強のどちらの活性であるかについて、および測定値については、蛋白質の活性を確認する系またはDNAの発現を確認できる系の種類によって適宜定められる。たとえば、蛋白質の活性を確認する系がサイトカイン産生抑制活性の測定系の場合には、測定値としてはサイトカイン産生量を用いることができ、被験物質添加群のサイトカイン産生量 > 被験物質無添加群のサイトカイン産生量となる場合、被験物質にはMC D 0 5 5 蛋白質活性阻害作用があるといえる。測定系にバックグラウンドやノイズの値が含まれる場合には、そのようなものを差し引いた値を測定値とすることは言うまでもない。

【0079】

本発明である蛋白質は、免疫抑制性受容体であることから、上述のスクリーニング方法あるいはトランスジェニック動物を用いた探索を通じて得られる化合物等は、自己免疫疾患、免疫不全、アレルギー性疾患、炎症性疾患等に対する有効な治療薬または予防薬となることが期待される。被験物質としては蛋白質、ペプチド、オリゴヌクレオチド、合成化合物、天然由来化合物、難酔生成物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが挙げられるがこれに限定されず、新規物質でも公知物質でもよい。

【0080】

【実施例】

以下の実施例により本発明を更に詳述するが、本発明はこれら実施例に限定して理解されることはできない。

【0081】

実施例1 退云子mcad 055のクローニング

(1) クローンC-SPLEN 2010588の取得

(1-1) cDNAライプラリーの作製と全長性の評価

ヒト超細胞の脾臓 (Spleen) より全RNAとして抽出されたmRNAを全RNAの状態で購入した (CLONTECH #64034-1)。購入したRNAよりオリゴキヤ法 [M. Matsumaya and S. Sugano, Gene, 188: 171-174 (1994)] を改良した方法 (WO 01/04288) によりcDNAライプラリーを作製した。Oligo-dT primerとおよびOligo-dT Primerを用いて、WO 01/04288に記載したようにBAP (Bacterial Alkaline Phosphatase) 处理、TAP (Tobacco Acid Pyrophosphatase) 处理、RNAライゲーション、第一鎖cDNAの合成とRNAの除去を行った。次いで、5'側と3'側のPCRアライマーを用いてPCR (Polymerase chain reaction) により2本鎖cDNAに変換し、Sfi Iで切断した。次いで、2 kb以上に分離したcDNA断片をDra I IIで切断したベクターPME18SFL3 (GenBank AB009884, EXPRESSION Vector) にcDNAの方向性を決めてクローニングし、cDNAライプラリーを作製した。Oligo-dT primer、Oligo-dT Primer、5'側と3'側のPCRアライマーの配列は、WO 01/04288に記載したものを使用した。

【0082】

これらより得たクローンのアラスミドDNAについて、cDNAの5'端の塩基配列をDNAシーケンシング試薬 (BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit, PE Biosystems社製) を用い、マニユアルに使ってシーケンシング反応後、DNAシーケンサー (ABI PRISM 3700, PE Biosystems社製) でDNA塩基配列を解析した。得られたデータをデータベース化した。

【0083】

オリゴキヤ法を改良した方法で作製したヒト脾臓 (Spleen) のcDNAライプラリーの約3万クローンの5' - 末端の全長率を次の方法で求めた。公共データベース中のヒト既知mRNAと5' - 末端配列が一致する全クローンについて、公共データベース

10

20

30

40

50

中の既知 mRNA 配列より表く 5' 一末端が伸びている場合、または 5' 一末端は短いが翻訳開始コドンは有している場合を「全長」と判断し、翻訳開始コドンを含んでいない場合を「非全長」と判断した。これをもとに 5' 一末端の全長率【全長クローニング数 / (全長クローニング数 + 非全長クローニング数)】を計算した。この結果、5' 一末端の全長率は、約 90 % であった。この結果より、取得した cDNA ライブライアリーカリのクローニングの 5' 一端配列の全長率が非常に高いことが分かった。

【0084】

(1-2) 全長塩基配列解析クローニングの選択および全長配列解析

上記のようにして得られた cDNA クローニングの 5' 末端配列については、GenBank、UniGene の complete cDNA の表記があるデータを対象にした BLAST による相同意検索を行い、ヒトの mRNA 配列に同一なものは除いた。次にクラスタリングを行い、相同意 90 % 以上かつコンセンサス配列が 50 塩基対以上の場合、同一グループを見なし、グループを形成させた。グループ内の、より 5' 一侧に長いクローニングを選択し、全長塩基配列解析を行なうクローニングを得た。

【0085】

全長塩基配列解析に選抜されたクローニングについて全長 cDNA の塩基配列を通常の方法により決定した。全長塩基配列は、両頭とも部分塩基配列が完全にオーバーラップするよう確定した。そのなかより C-SPLEN2010588 を取得した。

【0086】

クローニング C-SPLEN2010588 には、配列番号 2 で表される 413 個のアミノ酸からなる新規な蛋白質 MCD055 をコードする、配列番号 1 で表される 1239 残基の塩基配列からなるオーファンリーディングフレーム (ORF) を含む、全長 1997 塩基の塩基配列 (配列番号 3) からなる cDNA が含まれていた。このアラスミド C-SPLEN2010588 は、国際微生物寄託機関である独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに受託番号 FERM P-19165 として寄託されている。

【0087】

(2) cDNA クローニング塩基配列及びアミノ酸配列の解析

(2-1) MCD055 アミノ酸配列を HMMER フロログラム (R. Durbin, B. Eddy, A. Krogh, G. Mitchison, Cambridge University Press, (1998).) で Pfam データベース (<http://www.sanger.ac.uk/Pfam/>) を検索したところ 3 9 残基から 92 残基、132 残基から 189 残基、228 残基から 285 残基にかけ計 3 個のイムノグロブリンドメインが見られた。

【0088】

(2-2) 膜貫通予測プログラム (Takatsugu Hirokawa, Seah Boon-Chien and Shigeki Mitaku, SOSUI: Classification and Secondary Structure Prediction System for Membrane Proteins, Bioinformatics (formerly CABIOS), 1998 May, 14 (4): 878-879.) で膜貫通部位予測を行なった結果配列番号 2 で示されるアミノ酸配列では 2 から 24 残基、及び 317 から 339 残基に膜貫通領域が予測された。このことから配列番号 2 で示されるアミノ酸配列では、2番目のセドウから 24番目のアントマダガシクナルペアチド配列と予測された。また、その他の膜貫通領域が C 末端側の 1箇所であることが本蛋白質は N 末端側を細胞外に C 末端側を細胞内に向けた形で細胞膜表面に存在することが予測された。

【0089】

(2-3) [IV] × Y × × [LV] は一般的に ITIM モチーフとして知られているが (J Immunol, Vol. 159 (5): 2075-7 (1997))、このモチーフと機能的に同等と推測されるモチーフ GVVVYSVV が配列番号 2 で示されるアミノ酸配列の 875 から 881 残基にかけて認められた。

【0090】

実施例2 PCRによる発現アロファイルの確認

RT-PCRによるmcd055の組織発現アロファイル解析を行った。解析に用いたヒトRNAは以下の通りである。ヒト冠状動脈血管内皮細胞(HCAEC)及び、ヒト冠状動脈血管平滑筋細胞(CASMC)から定法によりmRNAを調製した。また、ヒト末梢血由来白血球を50μg/mlのPHAの存在下あるいは非存在下で24時間培養した後でmRNAを定法により調製した。さらにヒトの肺、腎臓、臍臍、脾臍、心臍、副腎、精巣、気管、胎児腎、臍のmRNAをクローンティック社より、大腸のmRNAをSTRATAGENE社より購入した。肝臍、小腸、の707α mRNAをクローンティック社より購入し、定法によってmRNAを調製した。次に、これら各mRNA 0.12μgよりオリゴdTプライマーを用いて1本鎖cDNAの合成を定法に従って行った。逆転写酵素としてはSuperScript II RNase H- Reverse Transcriptase (Invitrogen社)を用いた。また、PCRに用いたmcd055特異的なプライマーの配列はセンスプライマー-mcd055-F1(5'-GTT TTG TCT ACT CTG TGG TGC-3')、アンチセンスプライマー-mcd055-R1(5'-AGC ATC TCC CTT CCC ATT CCC-3')である。解析した結果、mcd055は肺、肝臍、心臍、活性化白血球、白血球、脾臍及び気管で発現していた(図1)。

【0091】

実施例3 可溶型MCD055蛋白質(MCD055細胞外ドメイン)の発現

mcd055遺伝子はPCRにより増幅後、各種発現ベクターに組み込んだ。蛋白質のN末端側にヒスチジンタグを接続して発現させたためには発現ベクターPIVEX2.4b NdeI(ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社)を用いC末端側にヒスチジンタグを接続して発現させたためには発現ベクターPIVEX2.8-d(ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社)を用いた。MCD055蛋白質はヒスチジンタグを接続した形で黒細胞系(Rapid Translation System:RTS)(ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社)で発現させた後にニッケルカラムを用いて精製する。なお、SOSU1による膜貫通部位検索では317番目のPtoより339番目のSからまでが膜貫通部位のため、可溶型MCD055蛋白質としてはそれよりN末端側1番目のMetから316番目のVal今までを発現させる。

【0092】

実施例4 抗MCD055抗体の作製

(1) MCD055の部分ペプチド(ペプチド抗原)の調製 MCD055部分ペプチドに対する抗体を作製するため、MCD055の部分ペプチドを蒸留水で1.0mg/mlに溶解し、1.0mg/mlのマレイミド化キーホールリンパベトモシアシン(PIERC E)と等量混合を行なう。室温で2時間反応後、NAP-10カラム(アマシム・フルマシバイオテク)で脱塩する。蛋白濃度は使用したKLH量を液量で割ったもの用い算出する。

【0093】

(2) MCD055抗体の作製

(2-1) ポリクローナル抗体の作製

MCD055に対するウサギポリクローナル抗体を作製するため、調製したペプチド抗原をそれぞれ各400μgずつ混合し、0.5mlとする。その後、等量のプロイント完全アジュバント(DIFCO)と混合し、ウサギの背部皮下に投与を行なう。2週間後、同量のプロイント不完全アジュバント(DIFCO)と混合したものを投与し、2週間後耳静脈より採血し抗血清を調製する。同様に実施例3で産生および精製した可溶型MCD055を300μg/b6doyで投与し、抗血清を作製する。

【0094】

(2-2) ベアチド抗体の作製

MCD055のアミノ酸配列より任意に選んで調製した各ベアチド抗原20μgを100

llの生理食塩水に溶解し、フロインド完全アジュバントと等量混合を行する。BALB/cマウス5週齢メスの腹腔に投与し、2週間後ペチド抗原20μgを100ulの生理食塩水に溶解し、フロインド不完全アジュバントと等量混合し同様に腹腔に投与する。1週間後眼底より採血を行い、抗体価の上昇をウエスタンプローティングにより確認する。すなわち粗抗体MCDO55蛋白質を4-20% SDS-ボリアクリルアミドゲル(TEFCO)にて電気泳動し、ミリボア社の方法にしたがってPVDF膜に転写する。転写後5%スキムミルク、0.05%Tween20を含む0.076Mリン酸緩衝液(PH6.4) (以下T-PBSと記載)にてプローティングを行う。採血した抗血清を0.5%BSAを含むT-PBSで500倍に希釈し、転写したPVDF膜と4℃一夜反応させる。メンブレンをT-PBSで3回洗浄し、ペルオキシゲーゼ標識抗マウスイムノグロブリン抗体(DAKO)を0.5%BSAを含むT-PBSで500倍に希釈し、メンブレンと室温で1時間反応させる。その後、メンブレンをT-PBSで3回洗浄後、ECL(アシッド・ファルミアバイオイク)で検出する。以上の操作で抗体価の上昇を確認し、抗原の最終投与3日後、脾細胞よりリンパ球を分離し、SP2/0-A914(ATCC No. CRL1581)と混液後、ポリエチレングリコールを用いて安東民氏・千葉丈ノ著「単クローラン抗体実験操作入門」(講談社)にしたがって細胞融合を行う。HAT培地によりハイブリドーマを選択し、1週間後に目的の細胞を產生しているハイブリドーマのスクリーニングを行う。

【0095】

0.1M炭酸緩衝液(PH9.5)を用い、実施例3で生産及び精製したMCDO55を用いて、細胞外ドメインを1μg/mlに希釈し、イムノフレート(MaxiSorb, NUNC)に50ul/1ウェル添加する。37℃で1時間反応後、イオン交換液で5回洗浄し、0.5%BSAを含む0.076Mリン酸緩衝液(PH6.4) (以下T-PBSと記載)を各ウェルに1000ul添加し、プローティングを行う。次に培養上清を各ウェルに添加し、37℃で1時間反応させた後、0.05%Tween20を含む生理食塩水で3回洗浄する。ペルオキシゲーゼ標識抗マウスイムノグロブリン抗体を10%ウサギ血清を含むT-PBSで1000倍に希釈し各ウェルに50ul添加する。37℃で1時間反応後、0.05%Tween20を含む生理食塩水で5回洗浄し、0.01%過酸化水素を含むテトラメチルベンゼン溶液を各ウェルに添加する。室温で10分間反応後、0.5M硫酸溶液で反応を停止する。フレート分光光度計(NJ-2100、日本インターメッド)で450nmの吸光度を測定する。この結果をもとに、MCDO55細胞外ドメインと反応する細胞を選択し、限界希釈法によりクローニングを行う。10日後、同様にスクリーニングを行い、MCDO55細胞外ドメインと反応する抗体を產生するクローナーを取得することができる。選択したハイブリドーマは10%FCS/RPMI1640培地(Invitrogen)で培養後、Hybridoma-SFM培地(Invitrogen)で培養し抗体を產生させ、ProSep-Aカラム(ミリボア)を用いて抗体を精製する。

【0096】

(2-3) 抗MCDO55モノクローナル抗体の作製

BALB/cマウス(メス、6週齢)の腹腔に精製したMCDO55細胞外ドメイン蛋白質20μgをフロインド完全アジュバントと等量混合して投与する。初回投与2週間後に抗原20μgを生理食塩水に溶解し、フロインド不完全アジュバントと等量混合後腹腔に投与する。さらに1週間後、抗体価の上昇を上記(2-2)記載の方法により確認し、最終投与を行う。マウスの腹腔に抗原1000μgを投与し、3日後、脾臓を摘出する。脾臓よりリンパ球を分離し、P3×83-A9.8.1×10-1で混合し、ポリエチレングリコールを用いて細胞融合を行う。HAT培地によりハイブリドーマを選択し、1週間後に目的の抗体を產生しているハイブリドーマのスクリーニングを行い、MCDO55細胞外ドメインと反応したウエルを限界希釈法によりクローニングし、再度スクリーニングを行って抗MCDO55モノクローナル抗体を取得する。

【0097】

10

20

30

40

40

50

ハイブリドーマを10% FCS / RPMI 1640培地 (Invitrogen) で培養後、Hybridoma-SFM培地 (Invitrogen) で培養し、抗体を产生させ、ProseP-Aカラム (ミリポア) を用いて抗体を精製する。

【0098】

実施例5 MCD055発現形質転換株の作製

MCD055を安定に発現する形質転換株を以下的方法で作製する。即ち、 5×10^6 個のJuratka T細胞 (clone E6.1; ATCC) に $20 \mu\text{g}$ のMCD055発現アラスミド及び $1 \mu\text{g}$ のNeomycin耐性遺伝子発現アラスミド (pCDNA3.1 (+); Invitrogen社) をエレクトロポレーション法によって導入する。エレクトロポレーションはジーンバルサー-Iシステム (BIO-RAD社) を用いて 800V 、 $950 \mu\text{F}$ capacitanceにて行う。その後、 $0.3 \text{mL}/\text{mL}$ のG-418 (Invitrogen社) を含む培地にて選択培養を行い、G-418耐性クローニングを得る。次に得られた耐性クローニングを実施例6に記すフローサイトメトリー法で解析し、MCD055を発現しているクローニングを得る。

【0099】

実施例6 MCD055蛋白質発現確認

脾臓、末梢血などから調製したリンパ球や白血球分画、および、本蛋白質を発現させた Juratka T細胞の細胞膜にあける発現を、フローサイトメーターにより確認する。試験の対象となる 10^6 個の細胞を 0.1mL の 0.1% BSA含有PBSに懸濁させ、 $1 \mu\text{g}$ の本発明蛋白質の細胞外ドメインに対する抗体を添加し、室温で30分反応させる。このサンプルを遠心し、 2mL の 1% BSA含有PBSで3回洗浄後、 $100 \mu\text{L}$ の 0.1% BSA含有PBSに懸濁させ、FITC標識抗マウスIgG抗体を $1 \mu\text{g}$ を加えて室温でさらに30分反応させる。ふたたび 0.1% BSA含有PBSで3回洗浄した後、 1mL の 0.1% BSA PBSで再懸濁し、その再懸濁液に含まれるFITC陽性細胞の割合をフローサイトメーターにより検出、および算定する。

【0100】

実施例7 MCD055蛋白質抗体のI-L-2産生抑制活性測定

本発明蛋白質を恒常的に発現させた 2×10^6 個のJuratka T細胞を 96 穴フレートに種植する。 $1000 \mu\text{g}/\text{mL}$ のドキシサイクリンを添加した培地で1晩培養し、その後、抗CD3抗体をコートしたピース (ピース数: Juratka T細胞数 = 1 : 1)、および抗CD28抗体 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ を添加して48時間培養し、培養上清中に含まれるIL-2をELISAによって測定する。本発明蛋白質に対する抗体を抗CD3抗体ピース、および抗CD28抗体の添加と同時に加え、IL-2産生に対する影響を検討する。

【0101】

実施例8 MCD055蛋白質抗体によるリン酸化抑制反応

ドキシサイクリン添加によって本発明蛋白質を発現させた 1×10^7 個のJuratka T細胞に抗CD3抗体ピース (ピース数: Juratka T細胞数 = 1 : 1)、可溶性抗CD28抗体 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ を添加し、10分後にオルトバナジン酸ナトリウムを含むPBSで一回洗浄後、 $500 \mu\text{L}$ の溶解用緩衝液 (1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.6, 5 mM EDTA, 1 mM オルトバナジン酸ナトリウム、 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ ロイペチジン、 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ アプロチニン、 $25 \mu\text{g}/\text{mL}$ ニトロフェニル-P'-アグニジノペニソエート) を添加して30分水中で静置する。こうして得られた細胞溶解物に対してSDS電気泳動を行った後、PVDF膜にトランスファーし、抗活性MAPK抗体を用いてウエスタンプロットを行ってことにより、リン酸化ERK1/ERK2を検出す。本発明に対する抗体を抗CD3抗体ピースや抗CD28抗体と同時に添加し、ERK1/ERK2のリン酸化に対する影響を検討する。

【0102】

実施例9 細胞外ドメインの活性測定

非血縁者2人のドナー (A, B) の血液から調製した末梢血リンパ球 (PBMC) を 5% 40

ウシ胎児血清添加 RPMI 1640で 1×10^6 cells/mlに調製し、96穴フレートにA由来のPBMC懸濁液とB由来のPBMC懸濁液を100μlずつ添加して37℃、5%CO₂インキュベーター内で5日間培養する。実施例3で作製したMCD055細胞外ドメインを、リンパ球の添加と同時に10μg/ml添加する。その後、培地で100μMに調製したプロモデオキシウリジン(BrdU)を20μl添加し、24時間培養する。300分、10分遠心して細胞を沈殿させ、上清を除去して200μlのFicoll×Denzat(ロシュ)を添加して30分静置したのち、Ficoll×Denzatを除去し、100μlのペルオキシゲーゼ標識抗体BrdU反応液を加え、室温で90分静置する。PBGで3回洗浄した後、テトラメチルベンジン(TMB)を100μl添加して発色させた。発色5-80分後に25μlの1M硫酸を加えて反応を停止させ、OD450nmの10

蛍光度測定を行う。

【0103】

【発明の効果】

本発明のMCD055は、免疫機能の異常による疾患の発症あるいは進行に対してその原因となり得る蛋白質であり、自己免疫疾患、免疫不全、アレルギー性疾患、血管炎・肝炎・敗血性ショックなどの炎症性疾患、腫瘍等の予防あるいは治療のための医薬品の開発において、極めて有用である。

【0104】

また、遺伝子mcd055は、アンチセンス医薬品として、また遺伝子治療において利用することができ、蛋白質MCD055は、それ自体あるいはその可溶性断片(細胞外領域や各ドメイン)を作製することにより可溶性蛋白医薬品として有用である。さらに、MCD055またはその断片に反応性を有する抗体及びその抗体の一部は、生体内でのMCD055機能を制御する抗体医薬品として有用である。

【配列表】

〈110〉 Mochida Pharmaceutical Co., Ltd.
〈110〉 Research Association for Biotechnology
〈120〉 A novel immunosuppressive receptor
〈130〉 47681
〈160〉 3
〈170〉 Patentlu Ver. 3.1

⟨210⟩ 2

〈211〉 413

10

⟨212⟩ PRT

〈213〉 *homo sapiens*

⟨400⟩ 2

MLPSLGPMLL	WTAVLFLVPC	VGKTVWLYLQ	AWPNPVGFRGD	ALTLRCQGWK	NTPLSQVKFY	60
RDGKFLHFSK	ENQTLGMAA	TVQSRGQYSC	SGQVNYYIPQT	FTQTSCTANV	QVQELFPFFFF	120
LSAIPSPPEPR	EGSLVTLRQCQ	TKLHPLRSAL	RLLFSFHKGD	HTLQDRGPEP	ELC1PGAKEG	180
DGSLYWCVA	PEGGGVQKQQS	PQLEVRVQAP	VSPRVPLTLHH	GPADPAVGDM	VQLLCEAQRG	240
SPPILYSFYL	DEKIVGNHSA	PCGGTTSLLF	PVKSEQDAGN	YSCEAENSVS	RERSEPEKLS	300
LKGSQLVFTP	ASNLWLPWLP	ASLGLGMVIA	AALLVYVRSW	RKAGLPLSQI	PPTAPGGEQC	360
PLYANVHHQ	GKDEGVVYSY	VHRTSKRSBAA	RSAEPTVGKE	FYHLCGGEMP	AAQ	413

〈210〉 3

〈211〉 1997

3

⟨212⟩ DNA

⟨213⟩ hom

⟨400⟩ 3

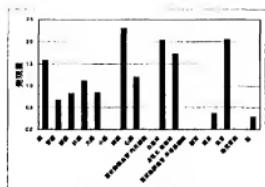
acacaccc

ggcaggatgtatattcca	cagacatcca	cacaaacttc	agagacgtcc	aiggltaag	420
tcgaagatgtttccac	cttgcgtgtgt	ggccatccc	cctcccgag	ccccgagg	480
gtatgcgtgtgtatgtt	gaccctgaga	tgatcgacaa	agctgcaccc	ccctgggtca	540
tccttttttc	cttccacaag	gacggccaca	cttgcgagga	caggggcctt	600
tcgtatcc	ggggatcaag	gagggagact	ctgggtttt	cggggatgg	660
agggtggcca	ggatccaaag	catggccccc	agctgggggt	cagatgtcg	720
cccgccgtgt	gtatgtttt	gtatgtttt	gtatgtttt	gtatgtttt	780
agcttcgtgt	tgatgtttt	tgatgtttt	tgatgtttt	tgatgtttt	840
agaatgttgtt	ggggatccac	tcgtatcc	ggggatccac	cacccccc	900
tgatgtttt	acatgtgtgt	ggggatccac	tcgtatcc	tcgtatcc	960
agggatgtgtgtgtgt	gtatgtttt	tcgtatcc	tcgtatcc	tcgtatcc	1020
gtatgtttt	tcgtatcc	tcgtatcc	tcgtatcc	tcgtatcc	1080
tcgtatcc	tcgtatcc	tcgtatcc	tcgtatcc	tcgtatcc	1140
tcgtatcc	tcgtatcc	tcgtatcc	tcgtatcc	tcgtatcc	1200
tcgtatcc	tcgtatcc	tcgtatcc	tcgtatcc	tcgtatcc	1260
tcgtatcc	tcgtatcc	tcgtatcc	tcgtatcc	tcgtatcc	1320
tcgtatcc	tcgtatcc	tcgtatcc	tcgtatcc	tcgtatcc	1380
tcgtatcc	tcgtatcc	tcgtatcc	tcgtatcc	tcgtatcc	1440
tcgtatcc	tcgtatcc	tcgtatcc	tcgtatcc	tcgtatcc	1500
tcgtatcc	tcgtatcc	tcgtatcc	tcgtatcc	tcgtatcc	1560
tcgtatcc	tcgtatcc	tcgtatcc	tcgtatcc	tcgtatcc	1620
tcgtatcc	tcgtatcc	tcgtatcc	tcgtatcc	tcgtatcc	1680
tcgtatcc	tcgtatcc	tcgtatcc	tcgtatcc	tcgtatcc	1740
tcgtatcc	tcgtatcc	tcgtatcc	tcgtatcc	tcgtatcc	1800
tcgtatcc	tcgtatcc	tcgtatcc	tcgtatcc	tcgtatcc	1860
tcgtatcc	tcgtatcc	tcgtatcc	tcgtatcc	tcgtatcc	1920
tcgtatcc	tcgtatcc	tcgtatcc	tcgtatcc	tcgtatcc	1980
tcgtatcc	tcgtatcc	tcgtatcc	tcgtatcc	tcgtatcc	1997
tcgtatcc	tcgtatcc	tcgtatcc	tcgtatcc	tcgtatcc	40

【図1の簡単な説明】

【図1】R T - P C R による m c d 0 5 5 の組織発現プロファイルを示す図である。

【図1】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	マークコード (参考)
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/68	区
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/15	区
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50	区
G 0 1 N 33/50	C 1 2 N 5/00	A

(12)発明者 杉山 友康
東京都墨田区横川5-4-3-512

(12)発明者 若松 勉
千葉県木更津市高柳1478-4-202

(12)発明者 入江 亮太郎
埼玉県さいたま市太田塚1-6-7

(12)発明者 石井 静子
千葉県木更津市矢那4508-19-202

(12)発明者 高橋 哲裕
東京都新宿区四谷一丁目7番地 持田製菓株式会社内

(12)発明者 佐藤 博行
東京都新宿区四谷一丁目7番地 持田製菓株式会社内

(12)発明者 真鍋 匡
東京都新宿区四谷一丁目7番地 持田製菓株式会社内

F ゲーム(参考) 2G045 AA34 AA35 BB10 BB14 BB20 BB41 BB46 BB50 BB51 CB01
 DA13 DA38 FB02 FB03
 4B024 AA01 AA11 BA63 BA80 CA04 CA07 CA09 CA12 CA20 DA03
 DA20 EA04 GA14 GA27 HA03 HA11 HA13 HA14 HA17
 4B033 QA01 QA05 QA21 QA41 QA53 QA61 QA79 QA89 QR32 QR35
 QR40 QR48 QR56 QR62 QR77 QR80 QA16 QA25 QA33 QA34
 QX01 QX02
 4B035 AA93X AA93Y AB01 AC14 BA02 BA03 BA25 CA24 CA44
 CA46
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA50 DA75 EA20
 EA50 FA71 FA74 GA26